

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) ORTAMINDA
GELİŞEN CROHN HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ ADHERENT-
INVASİVE *Escherichia coli* (AIEC) IRKININ ADEZİV VE İNVAZİV
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Hüsamettin AYGÜN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR

EYLÜL 2016

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Hüsamettin Aygün tarafından yapılan “BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) ORTAMINDA GELİŞEN CROHN HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ ADHERENT- INVASIVE *Escherichia coli* (AIEC) İRKİNİN ADHEZİV VE İNVAZİV ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

	<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	
Başkan	: Prof. Dr. Fikret UYAR		
Üye	: Prof. Dr. Kendal YALÇIN		
Üye	: Doç. Dr. Veysel TOLAN		
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hilal ACAY		
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Nurullah AKCAN		

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 30/09/2016

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2016

Doç. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Sahip olduğu bilimsel etik anlayışı ve yaklaşımıyla biyolojiye olan bakış açımın olgunlaşmasına katkı sunan ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca tecrübeleriyle bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Fikret UYAR'a çok teşekkür ederim.

Çalışmayı gerçekleştirmemde desteklerini benden esirgemeyen ve çalışmanın şekillenmesinde büyük katkıları olan Dr. Nicolas BARNICH'e ve Dr. Elisabeth BILLARD'a çok teşekkür ederim.

Çalışma koşullarını oluşturmada büyük yardımlarını gördüğüm Kafkas Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e çok teşekkür ederim.

Çalışma koşullarını oluşturmada yardımlarını benden esirgemeyen ve laboratuvar olanaklarını hiç düşünmeden bana sunan Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Murat KARAMEŞE'ye çok teşekkür ederim.

Çalışma koşullarını oluşturmamda gösterdikleri çabadan ötürü Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Aliye GÜLMEZ'e ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Volkan YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Çeviri konusundaki desteklerinden ötürü sayın Prof. Dr. Emine MEŞE'ye çok teşekkür ederim. Doktora süresince karşılaştığım sıkıntı ve problemlerde gösterdiği samimi çaba ve yardımlarından ötürü değerli arkadaşım M. Fırat BARAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın başlangıcında göstermiş oldukları çaba ve desteklerinden dolayı değerli kuzenim Recep ATEŞ ve Opr. Dr. Ömer BAŞOL'a çok teşekkür ederim.

Çalışma koşullarını oluşturmamda yardımlarını benden esirgemeyen uzun süreden bu yana tanıdığım, değerli arkadaşım Ahmet DEMİR'e çok teşekkür ederim.

Düşünceli ve yardımsever kişiliğiyle tanıdığım ve tez yazımı esnasında yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşım İsmail ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışma koşullarını oluşturmamda gösterdiği çabalarından ötürü Serhat UZAN'a çok teşekkür ederim.

Özellikle manevi desteklerinden ötürü değerli arkadaşım Emrah DEMİRAY'a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan, bu noktaya gelmemde çok büyük payı olan aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya 15.FEN.002 nolu projeye destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IX
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
KISALTMA ve SİMGELER.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Crohn Hastalığı.....	5
2.1.1. Crohn Hastalığının Gelişiminde Rol Alan Faktörler.....	8
2.1.1.1. Genetik Yatkınlık.....	9
2.1.1.2. Beslenme ve Yaşam Tarzı.....	11
2.1.1.3. İmmunolojik Faktörler.....	12
2.1.1.4. İntestinal Bariyer Geçirgenliği.....	17
2.1.1.5. Bağırsak Florası.....	19
2.1.2. Crohn Hastalarında ve Sağlıklı Bireylerde İntestinal Mukozadaki <i>E. coli</i> Lokalizasyonu.....	21
2.1.2.1. İltihabi Bağırsak Hastalarından İzole Edilen <i>E. coli</i> Irklarının Patojen Özellikleri.....	22
2.1.2.2. Adherent- Invasive <i>E. coli</i> (AIEC).....	23
-AIEC'in Tanımı.....	23
-AIEC Patojenitesinin Moleküler Temeli.....	24
-AIEC Irklarının Patojenitesiyle İlgili Karakteristik Gen Faktörleri.....	30
2.2. İntestinal Flora Üyelerinin Barındığı Bağırsak Sistemine Genel Bir Bakış.....	31
2.2.1. İnce Bağırsak.....	31
2.2.2. Kalın Bağırsak.....	33
2.3. İntestinal Bağışıklık Sisteminin Birincil Savunma Hattı Bileşenlerinden Mukus ve Özellikleri.....	34
2.3.1. Musin Domenleri.....	35
2.3.1.1. Transmembran Musin.....	36
2.3.1.2. Jel Formu Musin.....	36
2.3.2. Kolondaki Mukus ve Özellikleri.....	36

2.3.2.1.	Kolondaki Komensal Bakteriler.....	37
2.3.2.2.	Kolondaki Patojen Mikroorganizmalar.....	38
2.3.3.	Midedeki Mukus ve Özellikleri.....	39
2.3.4.	İnce Bağırsaktaki Mukus ve Özellikleri.....	39
3.	MATERYAL ve METOT.....	41
3.1	Materyal.....	41
3.1.1.	Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	41
3.1.1.1.	Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....	41
3.1.1.2.	%1'lik Triton X-100 Çözeltisinin Hazırlanması.....	41
3.1.1.3.	Sıvı Luria-Bertani (LB) Besiyerinin Hazırlanması.....	41
3.1.1.4.	Katı LB-Agar Besiyerinin Hazırlanması.....	41
3.1.1.5.	Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması.....	42
3.1.1.6.	Antibiyotiksiz (MEM + %10 FBS) Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması.....	42
3.1.2.	Kullanılan Biyokimyasallar ve İnorganik Bileşikler.....	42
3.1.3.	Kullanılan Cihazlar ve Diğer Materyaller.....	42
3.1.4.	Kullanılan Biyolojik Materyaller.....	43
3.2.	Metot.....	43
3.2.1.	Kolon ve İnce Bağırsağın Farelerden İzolasyonu ve Mukozal İçeriklerin Eldesi.....	43
3.2.2.	BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) Ortamlarının Hazırlanması...	44
3.2.3.	Farklı Bölgelerdeki BMSM Ortamlarında Gelişen Bakteri Sayısının Spektroskopik Olarak Tayini.....	45
3.2.4.	Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Bakteriyel Kültür Hazırlanması.....	46
3.2.5.	Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Bakteriyel İnokülümün Hazırlanması.....	46
3.2.6.	I-407 Hücrelerinin Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Hazırlanması.....	46
3.2.7.	Hücrelerin enfeksiyonu.....	47
3.2.7.1.	Adezyon Deneyi.....	48
3.2.7.2.	İnvazyon Deneyi.....	48
3.2.3.	İstatistik Hesaplamalar.....	49
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
4.1.	Farklı Bölgelerdeki BMSM Ortamlarında Gelişen Bakteri Sayısının Spektroskopik Olarak Tayininden Elde Edilen Bulgular.....	51
4.2.	BMSM Ortamlarının I-407 Hücreleri Üzerindeki Etkisiyle İlgili Mikroskopik Gözlemler.....	53
4.3.	FVB/N Farelerine Ait Adezyon ve İnvazyon Sonuçları.....	55

4.3.1.	Adezyon Sonuçları.....	55
4.3.2.	İnvazyon Sonuçları.....	56
4.4.	Balb/c Farelerine Ait Adezyon ve İnvazyon Sonuçları.....	59
4.4.1.	Adezyon Sonuçları.....	59
4.4.2.	İnvazyon Sonuçları.....	60
4.5.	FVB/N ve Balb/c Farelerine Ait Kontrole Göre % Adezyon ve İnvazyon Değerlerinin Birlikte Gösterimi.....	63
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	65
6.	KAYNAKLAR.....	73
	ÖZGEÇMİŞ.....	101

ÖZET

BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) ORTAMINDA GELİŞEN CROHN HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ ADHERENT- INVASIVE *Escherichia coli* (AIEC) İRKİNİN ADEZİV VE İNVAZİV ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Hüsamettin AYGÜN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2016

Şu ana kadar Crohn hastalığının gelişiminde rol alan faktörlerden biri olan bağırsak florası içinde hastalığın birçok karakteristiğiyle uyumlu patojen özellikleriyle Crohn hastalığına genetik olarak yatkın bireylerde spesifik hasara neden olan en olası ırk Adherent-Invasive *Escherichia coli* ırkıdır. Bununla birlikte bu ırk sağlıklı bireylerde de bulunduğu genelleştirilmiştir. Bir patobiyont olarak kabul edilir. Ayrıca ırka özgü moleküler hedefler henüz mevcut olmadığından bu ırkın sağlıklı mukozadaki yerleşim yerini belirlemek mümkün değildir. Şüphesiz ırkın sağlıklı intestinal mukozadaki yerleşim yerinin belirlenmesi ırkın hastalığın gelişimindeki rolüyle ilgili önemli veriler sunacaktır.

Çalışmamızda farklı zamanlarda kullandığımız FVB/N ve Balb/c farelerine ait kolon (CR) ve ileum (IR) bölgelerinden elde ettiğimiz mukozal içerikleri ve hücre kültür ortamını veya Luria-Bertani (LB) ortamını belli oranlarda içeren, Broth Mixing Sterile Mucosal Content (BMSM) ortamlarını oluşturduk. Böylelikle hem bu BMSM ortamlarını içeren hücre enfeksiyon deneyleri yoluyla LF82'nin adeziv/invaziv özelliklerini karşılaştırarak hem de LF82'nin BMSM ortamlarındaki bakteriyel kültürünü yaparak AIEC ırkı, LF82'nin sağlıklı intestinal mukozadaki yerleşim yeri ile ilgili ipuçları elde etmeyi amaçladık. I-407 hücre hattının kullanıldığı invazyon ve adezyon deneylerine ait sonuçlar her iki fare ırkında da genellikle benzerdi ve birbirini doğruladı. Sonuçlar bağırsak sisteminin farklı kısımlarından hazırlanmış her bir BMSM ortamında, LF82'nin üreme ve adeziv/invaziv özellikler bakımından oldukça farklı davranışlar sergilediğini gösterdi. Üstelik bu farklılıklar genellikle IR bölgesinden hazırlanan BMSM ortamında CR bölgesinden hazırlanan BMSM ortamına göre daha güçlü ve anlamlıydı. 3 saatlik hücre enfeksiyon periyodundan sonra, IR bölgesinden hazırlanan BMSM ortamını içeren hücre kültür ortamı, LF82'nin adezyonunu inhibe etti ve gentamisin uygulamasını takiben 1 saatlik ek hücre inkübasyon periyodundan sonra bu ortam LF82'nin invazyonunu da güçlü bir şekilde inhibe etmişti. Bu BMSM ortamında hücre yüzeyine yapışan LF82 oranı kontrole göre neredeyse yarı oranlardayken, intraselüler LF82 oranı, kontroldeki intraselüler LF82 oranı %100 kabul edildiğinde %5'ten daha azdı. Bakteriyel kültür sonuçlarına göre ise her iki bölgeye ait BMSM ortamında da LB ortamına göre daha yüksek bir bakteri üremesi görüldü. Üstelik IR bölgesinden hazırlanan BMSM ortamının, LF82'nin üreme kabiliyeti bakımından en iyi ortam olduğunun gözlenmesi ilginçti. Keza bir gecelik inkübasyondan sonra LB ortamıyla karşılaştırıldığında, bakteri bu ortamda ortalama iki katı sayıda üredi.

Sonuç olarak özgün bir yaklaşımla gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, sağlıklı intestinal mukozada kolon yerine ileumun, AIEC ırkı, LF82 için daha olası bir yerleşim yeri olduğuna dair önemli ipuçları sundu.

Anahtar Kelimeler: AIEC, LF82, Crohn Hastalığı, Broth Mixing Sterlie Mucosal Content (BMSM), Adezyon, İnvazyon.

ABSTRACT

COMPARISON ADHESIVE and INVASIVE FEATURES of CROHN'S DISEASE- ASSOCIATED ADHERENT-INVASIVE *Escherichia coli* (AIEC) STRAIN GROWING in BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) MEDIUM

PhD THESIS

Husamettin Aygun

DEPARTMENT of BIOLOGY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of DICLE

2016

To date Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) with pathogenic traits that is compatible with many characteristic of this disease is the most likely strain to cause specific damage to the people who are genetically susceptible to Crohn's disease (CD) in the gut flora that is one of factors playing a role in development CD. However AIEC usually is being accepted as pathobiont because of this strain is also isolated from healthy individuals. Besides, the exact localization of these strains in healthy intestinal mucosa is not possible to be detected due to the fact that specific molecular targets belonging these strains have not been determined yet. Undoubtedly, determining exact localization of these strains in the healthy intestinal mucosa will provide significant data related to role of AIEC in development CD.

In our study, we designed Broth Mixing Sterile Mucosal Content (BMSM) mediums composed of certain rates of cell culture medium or Luria-Bertani (LB) medium and mucosal contents obtained from colonic region (CR) and ileal region (IR) belonging to FVB/N and Balb/c mice that we used different times. Thus, We aimed to obtain some clues about the exact localization of AIEC strain, LF82 in healthy intestinal mucosa via both using bacterial culture of LF82 in BMSM mediums and comparing adhesive and invasive abilities of LF82 with cell infections experiments including BMSM mediums. Results of adhesion and invasion experiments that using I-407 cell line, usually were similar and agree each other in both mice type. The results showed that LF82 exhibit rather different behaviors in terms of proliferation and adhesive/invasive features in each BMSM mediums prepared from different part of intestine. Moreover, these differences were stronger and significant in BMSM medium prepared from IR than in BMSM medium prepared from CR. After 3 hours cell infection period, cell culture medium including BMSM medium prepared from IR, inhibited adhesion of LF82 and after gentamicin treatment following additional one hour incubation period, it also had inhibited strongly invasion of LF82. In this BMSM medium, while rate of LF82 associated to the cell surface were almost half rates according control, rate of intracellular LF82 was more less than 5 % when rate of intracellular LF82 in control defined as 100 %. According bacterial culture results however, more bacterial proliferation was seen in both BMSM medium prepared from IR and CR than LB medium. Moreover, it was interesting to observe that BMSM medium prepared from IR was the best medium in term of the proliferation capability of LF82. Likewise after overnight incubation period, LF82 number growing in BMSM medium prepared from IR, was about twice in compared with LF82 number growing in LB medium.

In conclusion, this study which we performed with an original approach offered significant clues regarding to ileum being more likely localization site for AIEC strain, LF82 rather than colon in the healthy intestinal mucosa.

Key Words: AIEC, LF82, Crohn's Disease (CD), Broth Mixing Sterile Mucosal Content (BMSM), Adhesion, Invasion.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1.	Kolon ve ileumdan elde edilmiş BMSM ortamlarında gelişmiş LF82 ırkının O.D. (Abs)=0.1'e göre hesaplanmış sayıları	51
Çizelge 4.2.	FVB/N farelerine ait adezyon sonuçları	55
Çizelge 4.3.	FVB/N farelerine ait invazyon sonuçları	57
Çizelge 4.4.	Balb/c farelerine ait adezyon sonuçları	59
Çizelge 4.5.	Balb/c farelerine ait invazyon sonuçları	61

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Crohn hastalığının dünya üzerinde coğrafik olarak görülme sıklığı	5
Şekil 2.2.	Crohn hastalığından en çok etkilenen sindirim sistemi bölgeleri	6
Şekil 2.3.	Crohn hastalığında kolonoskopik görüntüler	7
Şekil 2.4.	Crohn hastalığının gelişiminde rol alan faktörler	9
Şekil 2.5.	İnce bağırsak lenfoid dokusu	15
Şekil 2.6.	Epitel hücreleri birbirine bağlayan kavşak proteinleri	18
Şekil 2.7.	AIEC LF82 ırkı tarafından enfekte edilmiş I-407 hücre hattının elektron mikrofrafı	24
Şekil 2.8.	İnce bağırsak villus yapısının şematik olarak gösterimi	32
Şekil 3.1.	İzole edilen kolon ve ileumun görünümü	44
Şekil 4.1.	Kolon ve ileumdan elde edilmiş BMSM ortamlarında gelişmiş LF82 ırkının O.D. (Abs)=0.1'e göre hesaplanmış sayılarını gösteren grafik	52
Şekil 4.2.	Kolon ve İleuma ait BMSM ortamlarındaki I-407 hücrelerine ait mikro-fotoğraflar	54
Şekil 4.3.	FVB/N farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği	56
Şekil 4.4.	FVB/N farelerine ait başlangıç inokülümüne göre % invazyon grafiği	58
Şekil 4.5.	FVB/N farelerine ait kontrole göre % invazyon grafiği	58
Şekil 4.6.	Balb/c farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği	60
Şekil 4.7.	Balb/c farelerine ait başlangıç inokülümüne göre % invazyon grafiği	62
Şekil 4.8.	Balb/c farelerine ait kontrole göre % invazyon grafiği	62
Şekil 4.9.	FVB/N ve Balb/c farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği	64
Şekil 4.10.	FVB/N ve Balb/c farelerine ait kontrole göre % invazyon grafiği	64

KISALTMA VE SİMGELER

Abs	:	Absorbans
AIEC	:	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i>
AMCase	:	Asidik Memeli Kitinazı
ATG5	:	Autophagy protein 5
ATG16L1	:	Autophagy related protein 16 Like 1
C°	:	Santigrat Derece
CARD15	:	Caspase Recruitment Domain 15
CDC	:	Centersfor Disease Control and Prevention
CDEC	:	Cell Detaching <i>Escherichia coli</i>
CBP21	:	Chitin Binding Protein 21
CEACAM6	:	Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 6
CFU	:	Colony Forming Unit
CHI3L1	:	Chitinase 3-Like-1
CH	:	Crohn Hastalığı
cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
DSS	:	Dekstran Sodyum Sülfat Tuzu
EDTA	:	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
EHEC	:	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
E-Kaderin	:	Epitelyal Kaderin
ExPEC	:	Ekstraintestinal Patojen <i>Escherichia coli</i>
FHIS	:	Fluorescence In Situ Hybridization
FBS	:	Fetal Bovine Serum
g	:	Gram
GalNAc	:	N-asetilGalaktozamin
GALT	:	Gut-associated lymphoid tissue
GFP	:	GreenFluorescence Protein
HIF-1	:	Hypoxia-İnducibleFactor -1
Ig	:	İmmünoglobulin
IL	:	İnterlökin
INF γ	:	İnterferon Gama
IRGM	:	Immunity-Related GTPase family M protein
İEH	:	İntestinal Epitelyum Hücreleri
İBH	:	İltihabi Bağırsak Hastalığı

L	:	Litre
LB	:	Luria-Bertani
LC3	:	Microtubule-associated protein 1A/1B-Light chain 3
LPS	:	Lipopolisakkarid
LRRK2	:	Lösence Zengin Serin Treonin Kinaz 2
Lpf	:	Long Polar Fimbriae
MDP	:	N-asetil Muramil di Peptit, N-glikol Muramil di Peptit
MEM	:	Minimum Essential Medium
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
MMC	:	Migrating Motor Complex
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCF4	:	Nötrofil Sitozolik Faktör 4
NF- κ B	:	Nükleer Faktör Kappa-B
NOD2	:	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
OD	:	Optik Dansite
OmpA	:	Outer Membrane Protein A
OmpC	:	Outer Membrane Porin protein C
OMV _s	:	Outer Membrane Vesicles
PBS	:	Fosfat Tamponu
Pp	:	Peyer plakları
PRR _s	:	Örüntü Tanıma Reseptörleri
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
TLR	:	Tool Like Receptor
TNF α	:	Tumor Nekrosis Faktör- α
ZO-1	:	Zonula occludens-1
μ L	:	Mikrolitre
μ m	:	Mikrometre

1. GİRİŞ

Crohn hastalığı, sindirim sisteminin çeşitli kısımlarını etkileyebilen kronik inflamatuvar bir bağırsak hastalığıdır. Gelişiminde karmaşık genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı bu hastalığın etiyolojisi yapılan onca araştırmaya rağmen hala bilinmemektedir. Diğer taraftan hastalığın gelişiminde rol alan bu faktörler arasında bağırsak florasının ayrı bir önemi vardır. Çünkü hastalığın gelişiminde intestinal floranın rolü ile ilgili birkaç güçlü bulgu mevcuttur. Bunlardan biri Crohn hastalarında cerrahi müdahaleden sonra terminal ileumun luminal içerikle temasının, artmış inflamasyonla sonuçlanması; ancak fekal akım başka bir tarafa yönlendirildiğinde bu bölgelerde iyileşme belirtilerinin gözlenmesidir (Rutgeerts ve ark. 1991). Diğer, bazı Crohn hastalarında antibiyotik tedavisinin olumlu sonuç vermesi ve çoklu hayvan deneylerinde antibiyotik muamelesini takiben ülserasyon belirtilerinin azalması ve ayrıca germ-free hayvanlarda kolit bulgularına rastlanılmamasıdır (Sartor 2008). Ayrıca birçok epidemiyolojik çalışma, patolojik veri, genetik ve deneysel bulgu mikroorganizmaların Crohn hastalığının patojenezindeki rolünü desteklemektedir.

Diğer taraftan bağırsak florasının Crohn hastalığıyla olan ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda, hastalığın ileal tipine sahip bireylerde, normal bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış göstermiş bir *Escherichia coli* miktarının varlığı, dikkatleri bu türün üyeleri üzerine çekmiştir. Ayrıca Crohn hastalığını da kapsayan İltihabi Bağırsak Hastalığına (İBH) sahip bireylerden izole edilen *E. coli* ırklarının ExPEC ırklarına özgü farklı birtakım virulens genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Oysa intestinal patojenik *E. coli* ırklarının, kendine özgü virulens genleri ya çok nadirdir ya da hiç yoktur (Schultsz ve ark. 1997, Baumgart ve ark. 2007, Kotlowski ve ark. 2007, Martinez-Medina ve ark. 2009, Sepehri ve ark. 2011, Petersen ve ark. 2009, Schippa ve ark. 2009, Elliott ve ark. 2013). Ek olarak yapılan birçok serolojik çalışmada, Crohn hastalarında *E. coli* dış membran porin C'ye karşı üretilen antikorların (anti- Ompc) artış gösterdiği rapor edilmiştir (Mei ve ark. 2006).

Son dönemde Crohn hastalarından izole edilen *E. coli* ırkları içinde ayırıcı fenotipik patojen özellikleriyle Crohn hastalığı ile ilişkilendirilen yeni bir ırk keşfedilmiştir (Darfeuille-Michaud ve ark. 2004). Adherent-Invasive *E. coli* (AIEC) olarak isimlendirilen bu ırk bu hastalığa genetik olarak yatkın bireylerde spesifik hasara

neden olan en olası ırktır. Keza AIEC in vitro koşullarda intestinal epitelyum hücrelerine yapışabilir ve onları, hücre iskeleti elemanları aktin ve tübulin polimerizasyonu yoluyla invaze edebilir (Boudeau ve ark. 1999). Ayrıca in vitro koşullarda makrofajlar içinde yüksek miktarda TNF- α (Tümör Nekrosis Faktör- α) salınımına neden olmasının yanında, bu hücreler içinde canlı kalıp çoğalabilir. AIEC Crohn hastalarında bir tür adezyon reseptörü olan CEACAM 6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) moleküllerinin yüksek oranda ekspresyonunu indükleyebilir. Keza bu moleküller AIEC için birer adezyon reseptörüdür. AIEC ırkı aynı zamanda mukozal bariyeri geçerek lenfoid dokulara geçmesini sağlayan long polar fimriae (lpf)'ya sahiptir. Tüm bunlara ek olarak AIEC'in in vitro olarak oluşturulan kolitte inflamatuvar mukozal immün yanıtı, Tool like receptor 5 (TLR5) ve IPAF flagellin reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmak suretiyle şiddetlendirebilir (Carvalho ve ark. 2008).

AIEC'in, özellikle Crohn hastalığının ileal tipinde kontrole nazaran dokularda anlamlı derecede yüksek yoğunlukta bulunması ve hastalığın seyrini kötüleştirebilen belirlenmiş onca patojenite mekanizmasına rağmen hala hastalığın etiyolojisindeki rolü net olarak anlaşılabilmiş değildir. Çünkü AIEC ırkları Crohn hastalarından daha düşük yoğunlukta bulunmalarına rağmen sağlıklı bireylerde de tespit edilmiştir. Bu nedenle AIEC bir patojenden ziyade bir patobiyont olarak değerlendirilir. Bir patobiyont normal şartlar altında sağlıklı mukozada yerleşik olarak yaşar ve konukçuya zarar vermez. Ancak çevresel ve genetik şartlar bozulduğunda ya da değiştiğinde konukçuda patolojik reaksiyonların gelişmesine yol açar (Janet ve ark. 2011). Diğer taraftan mevcut şartlar altında AIEC ırkının mukozadaki lokalizasyonunun tam olarak neresi olduğunu belirlemek mümkün değildir; çünkü AIEC patotipine özgü moleküler hedefler henüz mevcut değildir. Bu açıdan AIEC'in intestinal mukozadaki yerleşim yerinin belirlenmesi hastalıkla olan ilişkisine dair önemli veriler sunacak, bu ırka özgü moleküler hedeflerin bulunmasını kolaylaştıracak belki de Crohn hastalığı için yeni özgün terapötik hedeflerin saptanmasını sağlayacaktır.

Mevcut çalışmamızda AIEC'in sağlıklı intestinal dokudaki yerleşim yeri ile ilgili farklı bir yaklaşım tarzı kullandık. Farelerde intestinal sistemin iki farklı bölgesinden (Kolon ve İleum) elde ettiğimiz mukozal içerikleri belli oranlarda besiyerleriyle karıştırıp filtre ederek BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) ortamını

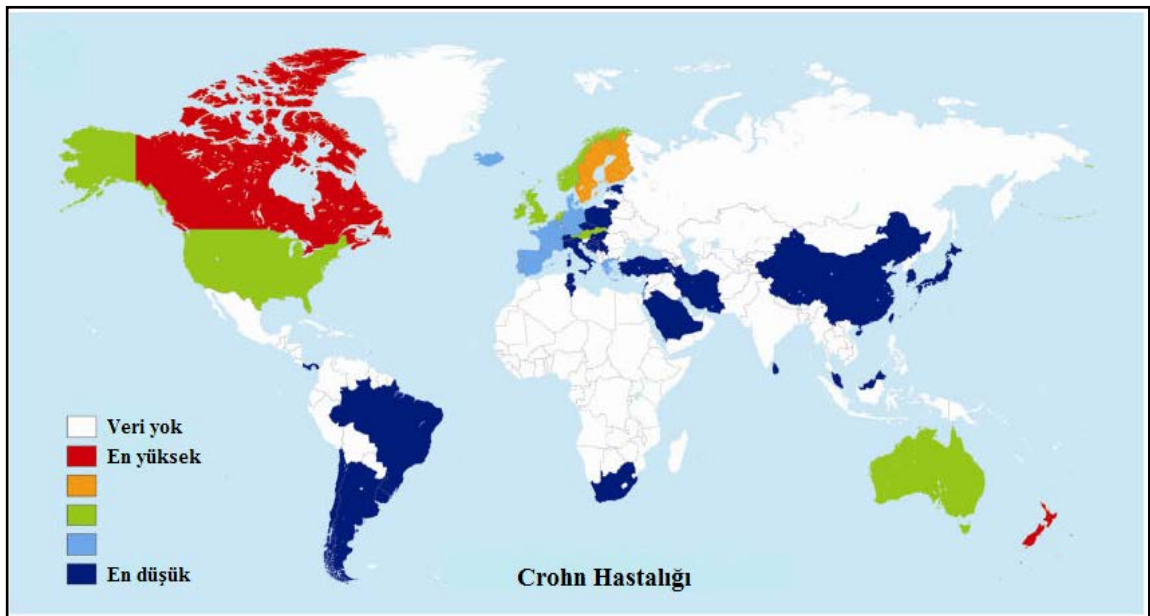
hazırladık. AIEC referans ırkı LF82'yi hem intestinal sistemin farklı bölgelerinden hazırlanmış BMSM ortamlarında kültüre ederek hem de bu BMSM ortamlarını belli bir oranda (%20) hücre kültür ortamına ekleyerek bu ırkın farklı ortamlardaki adheziv ve invaziv özelliklerini karşılaştırarak bu ırkın sağlıklı intestinal sistemdeki yerleşim yeri ile ilgili ipuçları elde etmeye çalıştık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Crohn Hastalığı

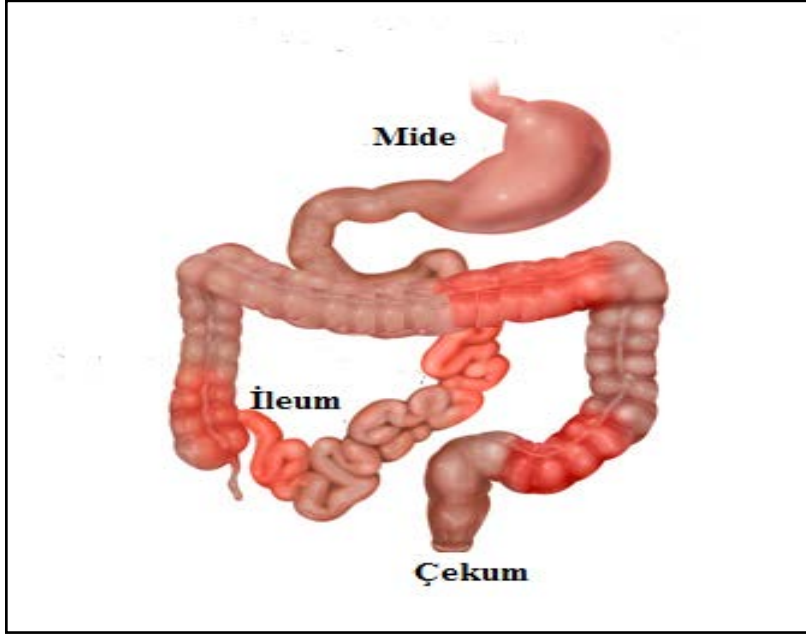
Crohn hastalığı ile ilgili ilk bulgular 1769'da İtalyan doktor Giovanni Battista Morgagni, 1898'de Jhon Berg ve 1904'te Antoni Lesniowski tarafından kayıtlara geçmesine rağmen hastalığın elle tutulur karakteristikleri 1930'da Dr. Burill B. Crohn tarafından tarif edilmiş ve hastalığın özellikleri Crohn ve ark. tarafından 1932'de "Bölgesel iletitis: patolojik ve kronik bir oluşum" başlığıyla makale olarak yayımlanmıştır. Bu tarihten itibaren hastalık tıbbi literatürde Crohn hastalığı (Crohn's disease) olarak anılmaya başlanmıştır (Naser ve ark. 2012).

Crohn hastalığının yer aldığı İltihabi Bağırsak Hastalıklarının (İBH) dünyada görülme sıklığı genel popülasyonun %0.4-1'ine denk gelmektedir. Crohn hastalığının en yaygın görüldüğü yerler endüstriyel olarak gelişmiş Kuzey Amerika ve Avrupa iken en az görüldüğü yerler Afrika ve Asya'dır (Şekil 2.1.). Kuzey Amerika ve Avrupa'da her 100 000 kişiden 27-48'inde bu hastalığa rastlanılmaktadır. Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (CDC) verilerine göre yaklaşık 1.4 milyon Amerikalı bu hastalığa sahiptir ve Crohn hastalığını de içine alan iltihabi bağırsak hastalıkları ile ilgili sağlık giderleri yıllık 1.7 milyon \$ civarındadır (Naser ve ark. 2012, Michail ve ark. 2013).



Şekil 2. 1. Crohn hastalığının dünya üzerinde coğrafik olarak görülme sıklığı (Szilagyi ve ark. 2014)

Hastalık cinsiyete göre kadın ve erkeklerde görülme sıklığı bakımından büyük bir farklılık arz etmez. Crohn hastalığının belirtileri tipik olarak on ile yirmili yaşlarda ortaya çıkar. Bununla birlikte ilaç tedavisi ile hastalığın kötü seyri (aktivasyon) giderilebilir ancak hastalık tamamen ortadan kaldırılamaz. Hastalığın görülme sıklığında 50-70 yaşlarında bir yükseliş vardır. Hastalıkla ilgili esas şikâyetler bu yaşlarda görülür (Naser ve ark. 2012).



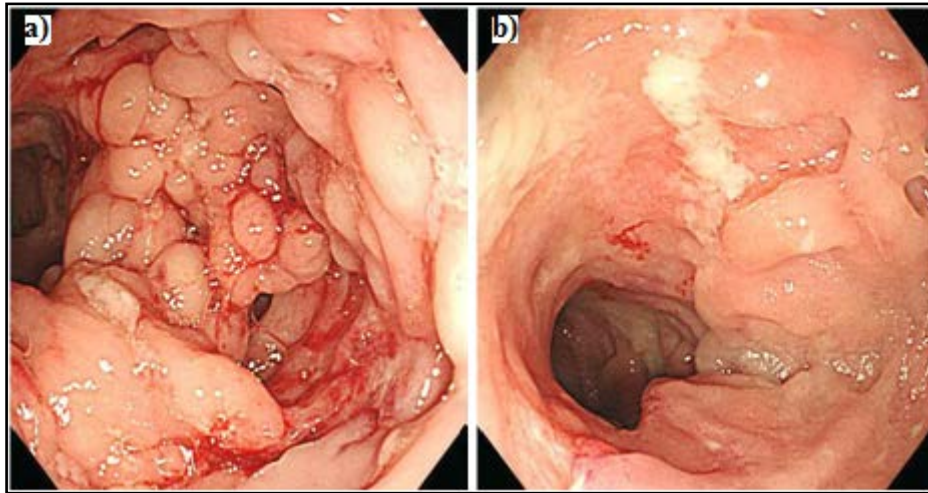
Şekil 2. 2. Crohn hastalığından en çok etkilenen sindirim sistemi bölgeleri (Anonim 2016_a)

Crohn hastalığı sindirim sistemini oluşturan ağız, yemek borusu, mide, ince ve kalın bağırsak gibi sindirim sisteminin bir veya birkaç kısmını etkileyebilir. Ağızdan anüse kadar sindirim sisteminin herhangi bir yerini etkileyebilmesine rağmen, en çok ileumda ve kalın bağırsakta hastalığa neden olmaktadır (Şekil 2.2). Crohn hastalığı sindirim sisteminde etkilediği bölgelerde kalınlaşma ve ülserler oluşturan kronik bir hastalık türüdür. Bağırsaktaki kalınlaşma bu bölgelerde darlıkların oluşmasına neden olabilir. Hastalıklı alan birkaç santimetre uzunluğunda ya da bir metreyi aşan uzunlukta olabilir (Şekil 2.3.). Kimi hastada anüs bölgesinde “fistül” adı verilen, iltihabın aktığı deliklere rastlanılabilir (Naser ve ark. 2012).

Crohn hastalığı, belirtilerini gösterdiği yani azdığı aktivasyon dönemi ve nispeten hastalıkla ilgili şikâyetlerin görülmediği remisyon dönemi ile seyreder. Crohn hastalığının üç değişik fenotipi vardır. Hastaların %70’i sadece inflamasyonla seyreden

(non-striktürel ve nonpenetran tip) tipe sahipken %17-20'si striktürlü tip, %13-15'i de fistül ve apse formasyonu gözlenen penetran tipe sahiptir. Crohn hastalığında hastalığın gastrointestinal sistemdeki anatomik lokalizasyonu zaman içinde belirgin değişiklik göstermez ancak fenotip değişebilir. Hastalık genellikle inflamatuvar fenotiple başlar ve zaman içinde kontrol edilmeyen inflamasyon, striktürlü (%27) veya penetran forma (%29) dönüşür. Hastaların %15-20'sinde yaşam kalitesini büyük ölçüde bozan kronik aktif bir formda seyrederek (Loftus ve ark. 2002). Ancak çoğunlukla tekrarlayan alevlenmelerle karakterize kronik formu daha yaygındır (%65-75). Teşhisten sonraki birinci yılda hastaların %55-65'inde remisyona ulaşılabilir ancak hastaların sadece %10-15'inde uzun süreli remisyona ulaşılabilirken hastaların %20'si tedavisiz remisyona girer. Remisyonda kalma süresi hastaların %50'sinde 2 yıldır. Hastaların % 50'si 10 yıl içinde cerrahi tedaviye ihtiyaç duyar. Cerrahi müdahale geçiren hastaların %30'u sonuçta yine cerrahi tedaviye gerek duyar. Crohn hastalığı, etkilediği bireylerde yaşam kalitesini düşürerek performans kaybına neden olur (Loftus ve ark. 2002, Frolkis ve ark. 2013).

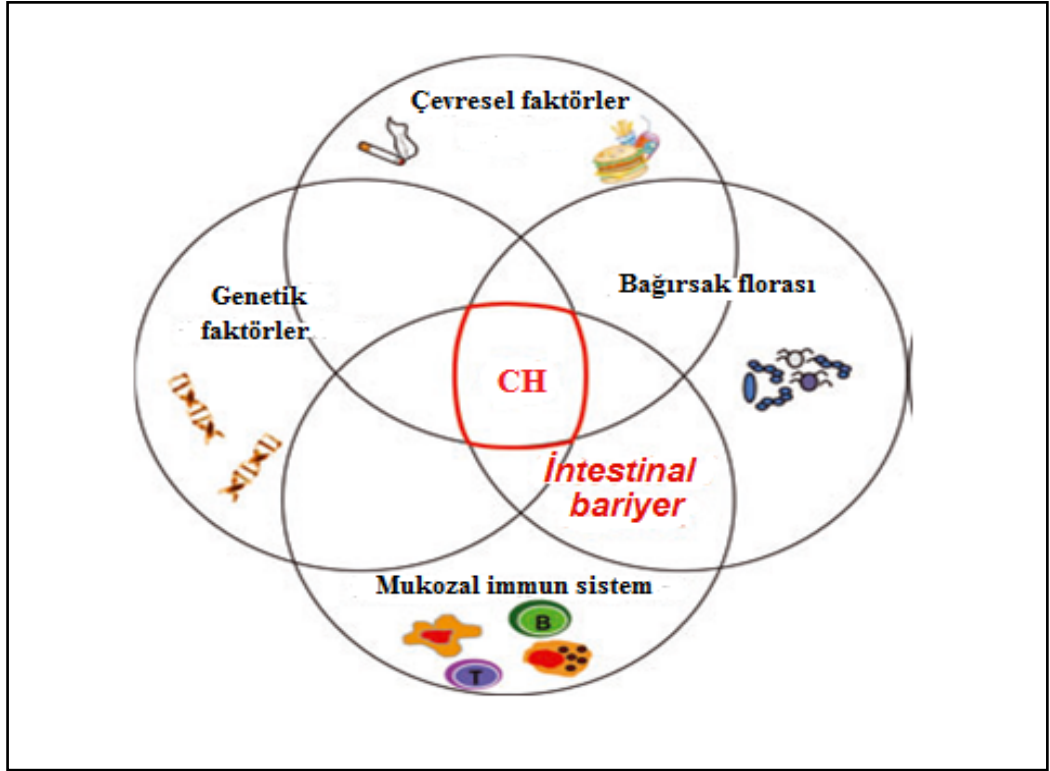
Başlangıç tedavisi steroidler (prednison gibi) ve antibiyotikler (klaritromisin, ampicilin, metronidazol gibi) ile yapılan ilaç tedavisidir ancak Crohn hastalığı için şifa sağlayan bir tedavi yoktur. Bununla birlikte bir veya daha fazla ilaçla yapılan medikal tedavi erken Crohn hastalığını tedavi etmek ve semptomlarını rahatlatmak için bir yol sunabilir (Naser ve ark. 2012).



Şekil 2.3. Crohn hastalığında kolonoskopik görüntüler: **a**, Kolon mukozasında kaldırım taşı görünümünde yalancı poliplerin oluşumu. **b**, Terminal ileumda daralma ve ülserler (Lim ve ark. 2013)

2.1.1. Crohn Hastalığının Gelişiminde Rol Alan Faktörler

Crohn hastalığının gelişiminde karmaşık çevresel ve genetik faktörler rol oynadığından bu hastalığın etiyolojisini belirlemek zordur. Hastalığın gelişiminde karmaşık çevresel ve genetik faktörler rol oynamasına rağmen, Crohn hastalığının patojenezinde tanımlanmış destekleyici bulgular içeren çevresel faktörler vardır ki bu çevresel faktörlerin en önemli olanlarından biri de bakteriler ve onların bileşenleridir. Bu bulgular bir diğer iltihabi bağırsak hastalığı olan Ülseratif kolit için de geçerlidir. Keza hem Crohn hastalığından hem de Ülseratif kolitten etkilenen sindirim sistemindeki bölgeler yüksek bir bakteriyel yoğunluğa sahip olmasına rağmen bu bölgelerde düşük bir bakteriyel çeşitlilik gözlenmektedir. Diğer taraftan Crohn hastalarında fekal içeriğin cerrahi olarak yönlendirilmesi ya da intravenöz yoldan temel besin monomerleriyle hastanın beslenmesi (total parental nutrition) gibi uygulamalar enterik inflamasyonun kontrolü için tedavi edici olarak kullanılmıştır. Bu hastalıkta enterik flora ile ilgili bir diğer bulgu ise probiyotik ve antibiyotiklerle yapılan tedavinin faydalı oluşudur (Sasaki ve ark. 2007). Bununla birlikte Genetik yatkınlık, Beslenme ve yaşam stili, İmmünolojik faktörler, İntestinal bariyer geçirgenliği ve İntestinal flora üyeleri gibi çeşitli faktörlerden birinin veya birkaçının Crohn hastalığının gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Crohn hastalığının gelişiminde rol alan faktörler. Crohn hastalığının (CH) patojenezi tam olarak bilinmemektedir. Şekilde görüldüğü gibi hastalığın gelişiminde bir veya birçok faktör rol alabilir (Keita ve ark. 2012)

2.1.1.1. Genetik Yatkınlık

Crohn hastalığı genetik bir hastalık değildir. Ancak son dönemde birçok genetik yatkınlık faktörü bu hastalarda tespit edilmiştir. Crohn hastalığı ve Ülseratif Kolit hastalığını kapsayan İBH ile ilgili genetik temelli çalışmalardan şu ana kadar 163 riskli lokus tespit edilmiş; bunların 30'u Crohn hastalığına özgü iken 110'u Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının ikisinde de ortak bir şekilde bulunan riskli gen lokuslarıdır (Barrett ve ark. 2008, Franke ve ark. 2010, Jostins ve ark. 2012). Crohn hastalarının doğal bağışıklık sisteminde, patojen tanıma ile ilgili; nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2) ya da diğer adıyla Caspase-recruitment domain 15 (CARD15) ve interleukin reseptör 23 (IL23R), otofaji ile ilgili ise; bağışıklık-bağılantılı GTPase M (IRGM) ve otofaji-bağılantılı 16-like 1 (ATG16L1) gen bölgelerinde polimorfizmler tespit edilmiştir (Lee ve Parkes 2011). NOD2 protein reseptörü sıklıkla makrofajlar, dendritik hücreler ve düşük seviyelerde intestinal epitelyum hücrelerinde hatta bazen T hücrelerinde sentezlenir (Gutierrez 2002, Shaw 2009) ve doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. NOD2, bakteriyel peptidoglikanın bir komponenti olan N-asetil Muramil

dipeptit ile (MDP) aktive edilir (Meylan ve ark. 2006, Kanneganti ve ark. 2007). NOD2'inin diğer ligantları N-glikol muramil dipeptit (mukobakteriyel) ve viral ssRNA'dır. NOD2'inin MDP ile aktifleşmesi, diğer aracılar yoluyla NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B) yolağını aktifleştirir. NF- κ B yolağının aktifleşmesi hücrelerde inflamasyon cevabına aracılık eden proinflamatuvar sitokinlerin üretimini ve sentezini indükler (Coulombe ve ark. 2009, Sabbah ve ark. 2009). Crohn hastalarında NOD2'de meydana gelen mutasyonlar bu gen ürününün bakteriyel MDP tanımada rol alan lpsince zengin domainini etkiler. Crohn hastalığı ile ilişkili diğer anahtar genler IRGM ve ATG16L1'dir (Hampe ve ark. 2007, Parkes ve ark. 2007, Rioux ve ark. 2007). Bu iki genin kodladığı proteinler otofajinin anahtar bileşenleridir. Crohn hastalarında bu iki gende meydana gelen mutasyonlardan ötürü makrofajlarda otofaji bozulmuştur. Otofaji evrimsel olarak korunmuş bir lizozomal degradasyon prosesidir. Otofaji genel olarak tüm hücrelerde meydana gelebilen bir olaydır ve organel ve protein yenilenmesinde büyük öneme sahiptir. Otofaji prosesinde sitoplazmik materyal (DNA, protein, organel veya bakteri) çift zarlı otofagozomlar tarafından sarılarak içeri alınır. Daha sonra endozomlar yoluyla lizozomlara geçirilip orada sindirilerek ortadan kaldırılır. Açlık durumunda hücreler besin ve enerji ihtiyacı hissettiklerinde de otofaji indüklenir (Fritz ve ark. 2011). Otofajiyle hatalı sentezlenmiş protein, DNA, lipid ve hasarlı organeller ortadan kaldırıldığı gibi makrofajlar aracılığı ile fagosit edilmiş bakteriler öldürüp, parçalanarak ortadan kaldırılır. Crohn hastalarında otofajinin anahtar genleri IRGM ve ATG16L1'deki polimorfizmin, bozulmuş intraselüler bakteriyel kleransla ilgili olduğu düşünülmektedir. (Gutierrez ve ark. 2004, Birmingham ve ark. 2006, Sanjuan ve ark. 2007).

Ek olarak, toll-like receptor 4 (TRL4), lpsince zengin serin treonin kinaz-2 (LRRK2), nötrofil sitozolik faktör-4 (NCF4) ve IL-23 R gibi gen lokuslarında da Crohn hastalığına yatkınlık ile ilgili olduğu düşünülen gen polimorfizmleri tespit edilmiştir (Carrière ve ark. 2014).

Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkaritlerin (LPS) saptanmasında anahtar rol oynayan TRL4, dendritik hücrelerin, makrofajların ve intestinal epitelyum hücrelerinde bulunan bir apikal hücre yüzey tanıma reseptörüdür. Crohn hastalığında bu gendeki polimorfizm bakteriyel lipolisakkaridlere karşı düşük bir duyarlılığa sebep olur (Tawfik ve ark. 2014). Aynı şekilde bu hastalarda LRRK2'de de

tek nükleotitte meydana gelen gen polimorfizmleri tespit edilmiştir. Bu genlerden yoksun olan farelerle yapılan deneylerde inflamasyon indükleyici DSS (Dekstran Sodyum Sülfat tuzu) uygulamasından sonra artmış inflamasyon cevabına karşılık daha zayıf klinik bulgular gözlenmiştir (Ouburg ve ark. 2005, Liu ve ark. 2011). Diğer taraftan mikrobiyal enfeksiyon cevabında fagositik hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen türevleri için önemli olan adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz'ın p40-phox altbirimini kodlayan NCF4 geni de Crohn hastalığına yatkınlık geni olarak literatürdeki yerini almıştır. Keza moleküler NADPH oksidazda meydana gelen defektlerin kronik granülomatöz hastalıklarla sonuçlandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Volpp ve ark. 1988). Tüm bu çalışmalar makrofajların Crohn hastalığında meydana gelen ümmün disfonksiyonda anahtar bir role sahip olabileceğini göstermektedir (Tawfik ve ark. 2014).

Son olarak Crohn hastalığında IL23R geninde de bazı polimorfizmler gözlenmiştir. Dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından sentezlenen IL-23R, inflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyerek intestinal inflamasyona katkıda bulunabilir (McGovern ve Powrie 2007).

2.1.1.2. Beslenme ve Yaşam Tarzı

Crohn hastalığında rol oynayan çevresel faktörler net olarak anlaşılabilmiş değilse de hastalıkla ilişkilendirilebilen bir dizi araştırma bulgusu mevcuttur. Hastalığın inisidansında coğrafik dağılıma bakıldığında az gelişmiş ülkelerde bu hastalık düşük bir görülme sıklığına sahipken gelişmiş ve hızla gelişmekte olan ülkelere yüksek bir görülme sıklığına sahiptir (Akobeng ve Thomas 2007). Dolayısıyla birçok araştırma batı hayat tarzının hastalığın gelişiminde nasıl bir rol oynadığını tanımlamaya odaklanmıştır. Sıkı kişisel hijyen, yüksek antibiyotik kullanımı ve yüksek yağ-karbonhidrat temelli beslenme alışkanlığı yüksek oranda batı ülkelerinde tercih edilen bir hayat tarzıdır. Batı tarzı beslenme intestinal floradaki bakteri kompozisyonunu değiştirir. Batı tarzı beslenmenin intestinal flora ve bağırsak fizyolojisi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek yağ/şeker kombinasyonundan oluşan diyetle beslenen farelerde kontrollerle karşılaştırıldığında incelmış bir mukozal zar, artmış bir intestinal geçirgenlik ve yükselmiş TNF α salınımı gözlenmiştir; bu da bağırsaklardaki bakteriyel kompozisyonu değiştirmiş ve Crohn hastalığı ile yakından ilişkili AIEC LF82

bakterisinin bağırsak epiteline yüksek oranda kolonize olmasına neden olmuştur. (Martinez ve ark. 2014). Yağlar zaten kendi başına zararlı özelliklere sahipken, yağlarda kullanılan emigülatörler de sindirim sistemi için zarar teşkil etmektedirler. Emigülatörler deterjan karakterli maddelerdir. Yiyecek katkı maddesi olarak kullanılan ve bir emigülatör olan polisorb-80'nin intestinal geçirgenliği arttırdığı ve intestinal M hücrelerine bakteriyel geçişi arttırdığı yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (Roberts ve ark. 2010). Benzer olarak batı-tarzı diyetinde yüksek oranda bulunan bir polisakkarid olan maltodekstrin tüketimi İleal Crohn hastalığının baskın üyesi AIEC LF82 ırkının intestinal epitelyum hücrelerinde güçlü bir şekilde biyofilm oluşturmaya neden olur (Agus ve ark. 2014). Diğer taraftan bir muz cinsinin (plantain) Crohn hastalığı ve kolon kanseriyle ilişkili *E. coli* bakterilerinin invazyon ve adezyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. İlginç bir şekilde bu muz cinsinin yoğun olarak tüketildiği Afrika ve Hindistan gibi bölgelerde hem Crohn hastalığı gibi iltihabi bağırsak hastalıklarının hem de kolon kanserinin düşük bir görülme sıklığına sahip olduğu görülmüştür (Roberts ve ark. 2010).

Hem Crohn hastalığı hem de Ülseratif kolit hastalığının gelişiminde rol alan bir diğer faktör sigara içme alışkanlığıdır. Yapılan bir dizi çalışmada sigara içmenin Crohn hastalığının seyrini daha da kötüleştirdiği görülmüştür. Ülseratif kolitte ise tam tersi bir durum söz konusudur. Sağlığa zararlı birçok özelliğe sahip olmasına rağmen sigara içme, Ülseratif kolit hastalığının şiddetini düşürmektedir (Cotton ve ark. 1994, Parkes ve ark. 2014).

2.1.1.3. İmmünolojik Faktörler

Crohn hastalığını da içinde barındıran İBH, bağırsak mukozasında kronik ve harabiyet verici bir inflamasyon cevabıyla sonuçlandığı için doğuştan ve uyarlanır bağışıklık sisteminin ikisi de bu hastalığın patogeneğinde genetik yatkınlık faktörleri ile birlikte önemli bir rol oynar. Doğuştan bağışıklık sistemi yabancı ajanlara karşı konukçunun geliştirdiği birincil savunma sistemidir. Doğuştan bağışıklık sisteminin sindirim sistemindeki ana bileşenleri; intestinal boşluğu döşeyen epitelyum hücreleri ve onları kaplayan mukus salgısının oluşturduğu Fiziksel Bariyer, Fagosistik Hücreler, Dendritik Hücreler, Doğal Öldürücü Hücreler, Sitokinler, Kompleman sistem ve C-reaktif proteinler gibi İnflamasyon-İlişkili Proteinler, Defensin ve Katelisidin gibi

Antimikrobiyal Peptidler ve Örgü Tanıma Reseptörleri'nden (PRR_s) oluşur. Hepsi olmasa da doğal bağışıklık sisteminin bu bileşenlerinin birçoğu Crohn hastalığı gibi iltihabi bağırsak hastalıklarında intestinal mukozada kontrolsüz inflamasyon cevabına neden olmak üzere uyarılır. Diğer taraftan doğuştan bağışıklık, uyarlanır bağışıklık ile birlikte çalışır. İltihabi bağırsak hastalıklarında yardımcı T hücre profilinin ve B hücre aktivitesinin de buna bağlı olarak değiştiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Basso ve ark. 2014).

Epitel bariyer; intestinal epitelyum hücreleri (İEH), mukus zarı ve tıkayıcı kavşaklar tarafından oluşturulan fiziksel bir bariyer görevi görür. İEH, sindirim sisteminden iyonların ve besinlerin emiliminden ve PRR_s'leri aktive edebilen bağırsak lümenindeki bakterilerin epitel hücre yüzeyine tutunmasını engellemekten sorumludur (Maloy ve Powrie 2011). İEH'de meydana gelen uyarılma bağışıklık sistemi ile etkileşime geçen proinflamatuvar proteinlerin sentezine yol açar ve İBH hastalarında epitel bariyer daha duyarlı ve geçirgendir (Gerova ve ark. 2011). Aynı şekilde bu hastalarda birer tıkayıcı kavşak bileşeni olan occludin ve diğer ilişkili proteinlerin sentezinde bir azalma ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin yol açtığı hücrenin yapısal bütünlüğünde bozulmalar söz konusudur. Bu değişim hastalardaki artmış intestinal geçirgenliğe katkı sunar (Mankertz ve ark. 2000). Bu hastalarda intestinal bariyer geçirgenliğine ilişkin bir diğer bulgu proinflamatuvar sitokin IL-6'nın bir diğer tıkayıcı kavşak proteini claudin-2'nin sentezini arttırmak suretiyle epitel bariyer geçirgenliğini etkilemesidir (Suzuki ve ark. 2004). Ayrıca ülseratif kolit ve Crohn hastalarında musin ekspresyonunda birbirinden farklı ekspresyon düzeyleri gözlenmektedir. Ayrıca bu hastalarda bozulmuş bir mukus üretimi söz konusudur (Buisine ve ark. 2001). Onun için İBH'de epitel bariyerin birçok bileşeni bir şekilde değişime uğramıştır. Bu bileşenlerden sadece birinin mi hastalığın gelişiminde rol oynadığı ya da hastalığın, hepsinin ortaklaşa etkileşiminin bir sonucu olarak mı ortaya çıktığının anlaşılması için bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Basso ve ark. 2014).

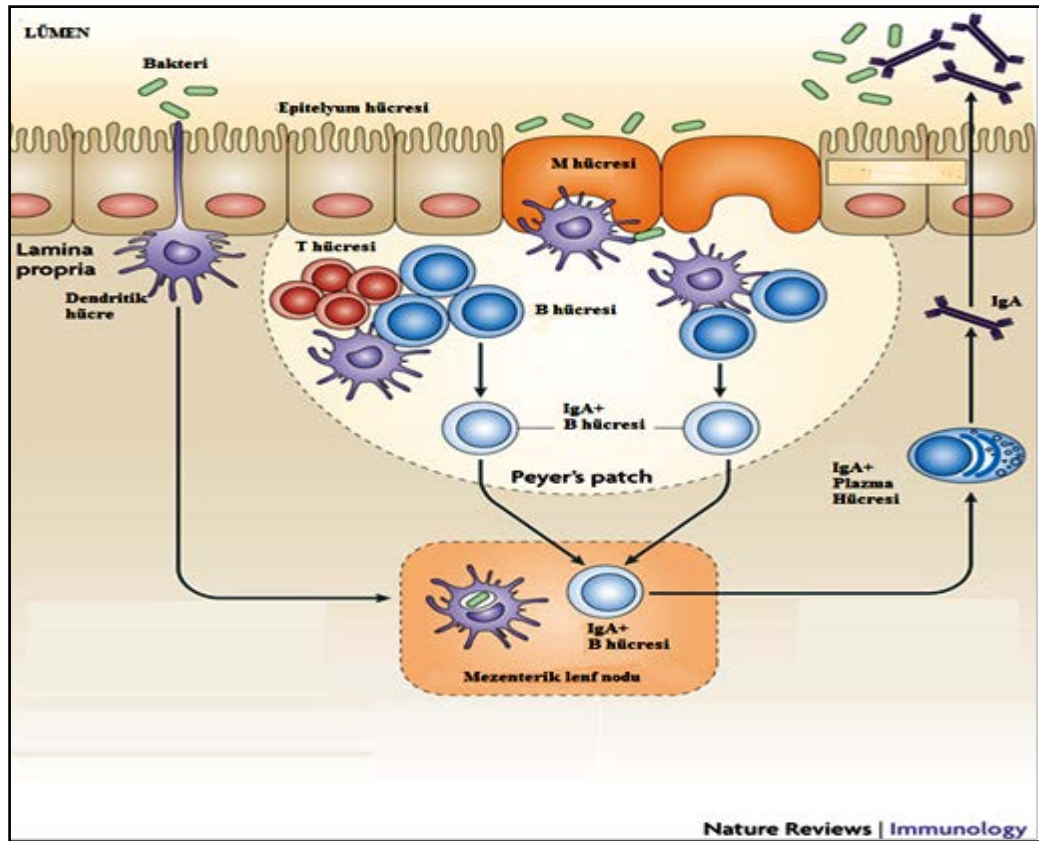
Epitel bariyer geçirgenliğinde meydana gelen değişimler iltihabi bağırsak hastalığına sahip kişilerin sindirim sistemini bakteriyel geçişe daha duyarlı hale getirir. Böylece sindirim sisteminde yerleşik antijen sunan hücreler yüzeylerinde intestinal bakterilere ait antijenleri bulundurmaya başlar. Bu, bağışıklık sisteminin lokal bir

şekilde inflamasyon cevabını sürdürmesine yol açar. Akabinde antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki yüksek bakteriyel antijen miktarı ek inflamasyon medyatörlerinin üretimine neden olur. Sindirim sisteminde makrofajlar, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler ve B hücreleri gibi dendritik hücrelerin yüzeyindeki toll like receptor'lerin (TLR) aşırı stimülasyonu, kronik inflamasyonun gelişimine neden olur. İBH hastaları intestinal epitelyum hücrelerinde sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında TLR ekspresyonunun farklı bir patternine sahiptir. Hem Crohn hastaları hem de Ülseratif kolit hastalarında TRL4 ekspresyonu artış göstermiştir. Crohn hastalarında ise TRL3 ekspresyonu azalmıştır (Cario ve Podolsky 2000). Ayrıca Crohn ve Ülseratif kolit hastalarında TRL1, TRL2, TRL4, TRL6 ve TRL9 reseptörlerinin ilgili gen bölgelerinde polimorfizmler saptanmıştır (Torok ve ark. 2009).

Bir çeşit intraselüler PRR_s olan nükleotid bağlama oligomerizasyon domaini-2 (NOD2), epitel hücreleri ve B hücreleri gibi birçok hücrede bulunur ve bakteriyel hücre duvarı bileşeni olan peptidoglikan moleküllerini tanır. Bu yolla klasik NF- κ B yolağını veya inflamazomları aktive edebilir. İltihabi bağırsak hastalarında paneth hücreleri tarafından salgılanan α -defensin ve diğer antimikrobiyal peptitlerin azalmış ekspresyonuna eşlik eden NOD2 polimorfizmi intestinal epiteli lümenal bakteriyel enfeksiyona duyarlı hale getirir. Ayrıca NOD2'deki gen mutasyonları otofaji prosesini bozarak dendritik hücrelerin ilgili bakteriyel antijenleri yüzeylerinde sunmasına yol açar (Hugot ve ark. 2001, Wehkamp ve ark. 2004, Cooney ve ark. 2010). NOD2 proteininden yoksun isojenik mutant farelerle yapılan deneylerde yapay inflamasyon indükleyicileriyle (DSS gibi) oluşturulan kolitten sonra lenfosit hücre sayısında ve bu hücrelerin proliferasyon oranında düşüş gözlenmiştir ki bu da hayvanlarda artmış riskle beraber zayıf bir hastalık cevabına neden olmuştur (Jiang ve ark. 2013, Couturier-Maillard ve ark. 2013). Bununla birlikte diğer benzer çalışmalarda NOD2 mutant farelerinde CD4⁺ Treg hücrelerinin artış gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmalar insanda NOD2 polimorfizminin ya da mutant farelerdeki NOD2 eksikliğinin spontan inflamasyon cevabını indüklemeye tek başına yeterli olmadığını kısmen açıklayabilir (Amendola ve ark. 2014).

Dendritik hücreler patojenlere karşı bağışıklığın kontrolünde ve bağışıklık tolereansında temel bir role sahiptirler. İntestinal flora üyelerini patojenlerden ayırt etmelerini sağlayan TLR ve NOD2 reseptörlerinin geniş bir çeşidini bünyelerinde

barındırırlar. Dolayısıyla dendritik hücreler, T hücre cevabını aktive edebilir veya susturabilirler. Sağlıklı bireylerde dendritik hücreler farklılaşmamış bir fenotipe sahiptir. Tipik olarak dendritik hücreler dendritlerini epitelyum hücrelerini bir arada tutan tıkalı kavşakların arasından geçirerek bağırsak lümeni ile bağlantı kurarlar (Şekil 2.5.) (Niess ve ark. 2005). İnflamasyonlu intestinal epitelyumda dendritik hücreler yüksek bir antijen maruziyeti altındadır. Bu şartlara maruz kalan dendritik hücreler olgunlaşıp yüzey molekül örüntülerini modifiye ederek aktif bir fenotip sergilerler. Böylelikle etkili bir bağışıklık cevabın gelişimini tetiklerler (Varol ve ark. 2010). İltihabi bağırsak hastalığına sahip bireylerde veya deneysel olarak indüklenen kolitte hem dendritik hücreler hem de B hücrelerinin arttığı görülmüştür. Dendritik hücrelerin alt grupları E-kaderin denen molekülleri sentezlerler. Bu durum hastalıkta ortaya çıkan inflamasyon profilinde gözlenen bir durumdur. Keza E-kaderin+ dendritik hücreleri deneysel olarak oluşturulan kolitte bir yardımcı T hücre alt tipi olan Th17 gelişimine ve kolon hasarına katkı sunan IL-6 ve IL-23 gibi sitokinleri salgırlarlar (Siddiqui ve ark. 2010).



Şekil 2.5. İnce bağırsak lenfoid dokusu (Nature 2010₆)

Doğal öldürücü hücreler hasarlı hücreleri tanıyabilir ve ortadan kaldıracaktır. Bu hücreler aynı zamanda dendritik hücre olgunlaşmasını etkileyebilen interferon gama gibi sitokinleri üretebilir. İltihabi bağırsak hastalıklarında doğal öldürücü hücreler IL-21 reseptörlerini daha fazla eksprese eder ve bu daha güçlü bir IL-21 aktivasyonuna neden olup daha fazla proinflamatuvar sitokin üretimine yol açar. Bu koşullar aynı zamanda yardımcı T hücrelerinin Th17 alt hücre popülasyonuna dönüşümüne de yol açar (Takayama ve ark. 2010).

İntestinal epitelyum hücrelerindeki inflamasyonun kontrolünü sağlayan immünotolerans ve doğal bağışıklık yanıt, bir dizi mekanizma ile kontrol edilir. Bunlar; IgA sekresyonu, antimikrobiyal peptidlerin aracılık ettiği bakteriyel klerans ve/veya fonksiyonel otofajik prostestir. Crohn hastalarında bu proseslerde meydana gelen değişimler anormal bir immün cevapla sonuçlanıyor olabilir (Carrière ve ark. 2014).

IgA intestinal lamina propriada lokalize olmuş B lenfositler tarafından salgılanan bir immünoglobüldür. Salgılanan IgA, epitelyum hücrelerinden geçerek luminal antijenler ve bakterilerin tutulduğu mukus zarında alıkonur. İntestinal epitelyuma tutunmuş ya da lümende bulunan bakteriler, peyer plaklarında (Pp) bulunan B hücrelerini uyaran dendritik hücreler tarafından saptanırlar. Nihayetinde bu da spesifik IgA sekresyonuyla sonuçlanır (Hooper ve ark. 2012). Defektif IgA sekresyonuna sahip mutant fareler oluşturularak yapılmış bir çalışmada farelerin intestinal epitelinde yüksek derecede mukoza ilişkili filamentöz bakterilerin varlığı tespit edilmiştir (Suzuki ve ark. 2004). Bu da salgılanmış IgA'nın, intestinal epitelyumdaki bakteriyel kominitelerin yoğunluk ve kompozisyonunu düzenlediğini göstermektedir. Crohn hastalarından alınan örneklerle yapılan serolojik çalışmalar, bağırsaklarda normalde baskın-IgA varlığının baskın-IgG'ye doğru değiştiğini göstermektedir. Bu bulgular bu hastalarda başka bir savunma hattının varlığını desteklemektedir (Brandtzaeg ve ark. 2006). Keza IgG inflamatuvar etkilere sahip ve yaygın bakteriyel antijen flagelline spesifik olarak sentezlenir; çünkü neonatal IgG reseptörü FcRn, hematopoietik hücrelerde eksprese edilir ve farelerde anti-flagellin, IgG varlığında inflamasyonu indükler (Kobayashi ve ark. 2009).

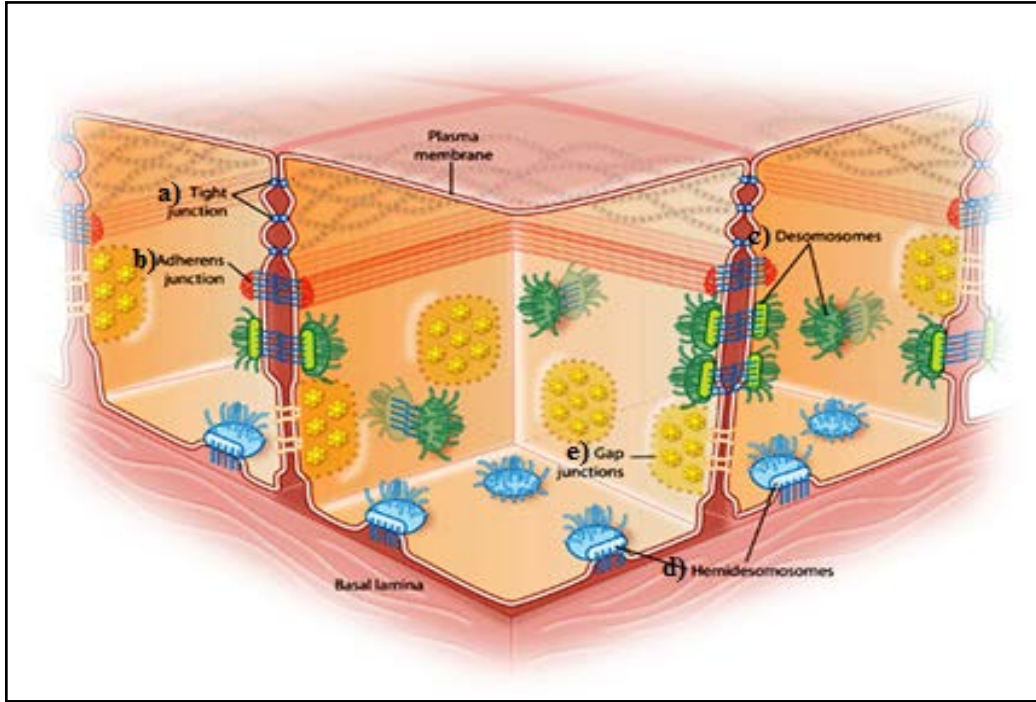
Bağırsak lümenindeki bakteriyel kompozisyonu dengede tutan bir diğer faktör komensal veya patojen bakterileri ortadan kaldıran antimikrobiyal peptitlerdir. İntestinal

epitelyum hücrelerinden salgılanan bu moleküller defensin olarak adlandırılır. Mikrobiyal hücre membranına bağlanan bu defensinler bakteriyel hücre membranında por oluşturmak suretiyle bakterileri ortadan kaldırırlar. İnsanda α ve β olmak üzere iki defensin sınıfı tanımlanmıştır. Bunlardan α -defensin başlıca nötrofiller ve paneth hücreleri tarafından salgılanırken; β -defensin genellikle epitelyum hücreleri tarafından salgılanır (Jarczak ve ark. 2013). Bu defensinlerin sentezi, ekstraselüler bakteriyel komponentleri tanıyan Tool-like reseptörler (TLR) ve intraselüler bakteriyel komponentleri tanıyan NOD reseptörlerinin aktivasyonu ile başlatılır. Bu aktivasyon ve akabindeki defensin sekresyonu, intestinal epitelyum ile kontak halinde bulunan patojenlerin hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar (Kaser ve ark. 2010). İnsan α -defensin 5'i salgılayan ve fonksiyonel olarak bu proteini salgılayamayan farelerde intestinal floranın değişimi karşılaştırmalı olarak gözlenmiş ve defensin'in floradaki bakteri yoğunluk ve kompozisyonunu regüle ettiği görülmüştür (Salzman ve ark. 2010). Başka bir çalışmada ileal Crohn hastalarının özellikle de NOD2'i mutasyonu taşıyan hastaların paneth hücrelerinde azalmış bir α -defensin ekspresyonu rapor edilmiştir (Wehkamp ve ark. 2005). Lizozim ve RegIII γ gibi diğer antimikrobiyal proteinler, intestinal epitelyum aşırı derecede bakteri veya bakteriyel antijenlere maruz kalınca paneth hücreleri tarafından salgılanırlar (Ayabe ve ark. 2000). Böyle bir durum konukçu savunmasına katkıda bulunarak hem patojenlerin hem de komensal bakterilerin mukozal penetrasyonunu engeller. Paneth hücrelerinden genetik olarak yoksun bırakılmış farelerde konukçu dokularına artmış bir bakteriyel geçiş rapor edilmiş ki bu da paneth hücrelerinin, intestinal bakterilerin bağırsak epiteli içindeki dağılımını düzenlediğini göstermektedir. Bu bağlamda Crohn hastalarında antimikrobiyal proteinlerin anormal sentezi bakterilere karşı intestinal bariyer geçirgenliğinin artışıyla ve sonuçta kronik inflamasyonla sonuçlanıyor olabilir (Vaishnava ve ark. 2008).

2.1.1.4. İntestinal Bariyer Geçirgenliği

Gastrointesinal epitelyum, intestinal lümen ve kan dolaşımı arasında tek sıra halinde uzanan ve fiziksel bir bariyer görevi gören hücrelerden oluşur (Agus ve ark. 2014). Bu hücrelerin % 80'i enterositlerden oluşurken geri kalan kısım enteroendokrin görevi gören Paneth hücreleri ve Goblet hücrelerinden oluşur (Van der Flier ve Clevers 2009). İntestinal bariyer suyun, iyonların ve besinlerin bağırsak lümeninden emilimini

sağlar. Bunu yaparken mukozal yüzeye tutunmuş mikroorganizmaların lümeninden içeriye geçişini engeller. Epitel hücreleri, çeşitli proteinlerden oluşan kavşaklarla birbirine bağlanır. Bunlar tıkayıcı kavşaklar (tight junctions), çıpalayan kavşaklar (desmosomes, adherent junctions) ve iletişim kavşaklarıdır (gap junctions) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Epitel hücrelerini birbirine bağlayan kavşak proteinleri. **a)** Tıkayıcı kavşaklar, hücreleri adeta dikiş tarzında birbirine bağlar. **b)** Çıpalayıcı kavşaklardan olan yapışma kavşakları her bir komşu hücreyi aktin filamentleri ile birleştirir. **c)** Bir diğer çıpalayıcı kavşak türü olan desmozomlar her bir komşu hücreyi daha güçlü bir şekilde ara filamentler yardımıyla birbirine bağlar. **d)** Hemidesmozomlar yine ara filamentler yardımıyla hücreleri bazal laminaya bağlar. **e)** İletişim kavşakları hücreler arasında suyun ve çeşitli iyonların geçişini sağlayan bir dizi kanaldan oluşur (Nature 2016_a)

Bu kavşakların intestinal bariyer geçirgenliğindeki önemi büyüktür. Birçok çalışmada Crohn hastalarında aktif faz sırasında intestinal bariyer geçirgenliği artarken, remisyon fazında bariyer geçirgenliğinin azaldığı rapor edilmiştir (Jenkins ve ark. 1987, Sanderson ve ark. 1987, Jenkins ve ark. 1988, Adenis ve ark. 1992, Benjamin ve ark. 2008). Aktif fazda bulunan birçok Crohn hastasından alınan biyopsi örneklerine ait elektron mikrograflarında kontrollerle karşılaştırıldığında tıkayıcı kavşakların sayısında bir azalmanın olduğu gözlenmiş ve bu hastalarda tıkayıcı kavşak proteinlerinin ekspresyonunda oransal bir uyumsuzluk olduğu rapor edilmiştir. Bu proteinlerden claudin-2 ekspresyonunun artış gösterdiği görülürken claudin-5 ve occludin proteinlerinin ekspresyonunda bir azalma olduğu görülmüştür (Zeissing ve ark. 2007).

Ayrıca birçok Crohn hastasının mezenşimal dokularında *E.coli*, *Enterococcus spp.* ve *Colistridium perfringes* gibi bakterilerin varlığı saptanmıştır. İntestinal bariyer geçirgenliğindeki değişimin önemli bir rol oynadığı sub-mukozadaki humoral bağışıklık yanıtını aktive edebilen bakteri ve diğer antijenlerin, içerdeki dokulara geçmesi Crohn hastalarındaki yangısal yanıtı neden oluyor olabilir (Ambrose ve ark. 1984, Takesue ve ark. 2002).

2.1.1.5. Bağırsak Florası

İnsan sindirim sistemi boşluğu birbirinden farklı 500-1000 türden oluşan 10^{14} mikroorganizmanın teşkil ettiği bağırsak florasına ev sahipliği yapar (Gill ve ark 2006). Düşük orandaki aktinobakter, protist, virüs ve mantarların yanı sıra bağırsak florası büyük oranda bakterilerden oluşur. Bağırsak florasındaki en baskın bakteri familyaları *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* (%90) iken kalan diğer kısım *Escherichia* ve *Helicobacter* cinslerini de kapsayan *Proteobacteria* familyasından oluşur (Eckburg ve ark. 2005, Ley ve ark. 2008, Peterson ve ark. 2008, Arumugam ve ark. 2011). Sindirim boşluğundaki floranın yoğunluğu genellikle mideden kolona doğru artan bir yoğunluğa sahiptir; midede gram başına 10^2 CFU olan bakteri yoğunluğu kolonda gram başına 10^{12} CFU'ya ulaşır (Sartor 2008). Bağırsak florasının metagenom olarak da ifade edilen genomu gen sayısı bakımından insan genomunun 150 katıdır (Qin ve ark.2010). Bağırsak florasının kompozisyonu bireyden bireye değişiklik arz eder. Flora üyelerinin kompozisyonunu; hijyen, coğrafik dağılım ve beslenme alışkanlıkları büyük oranda etkiler (De Filippo ve ark. 2010). Bu faktörlerin yanında konukçunun genetik özellikleri de bu dağılımda rol oynar; İkizlerdeki fekal bakteriyel tür benzerliği normal kardeşleriyle karşılaştırıldığında daha yüksektir. Ancak aynı çevre ve beslenme alışkanlıklarına sahip normal kardeşlerdeki flora bakterilerinin kompozisyonunun da evli eşlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Zoetendal ve ark. 2001).

Bağırsak florası, konukçu metabolizmasını da büyük oranda etkiler. Bağırsak florasının kimi üyeleri vücutta meydana gelen çeşitli patolojik mekanizmaların gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak yer alır. Son bulgular; kolon kanseri, tip-I diyabet, insülin direnci, non-alkolik yağlanmış-karaciğer hastalıkları, astım, alerji ve iltihabi bağırsak hastalıkları gibi çeşitli insan hastalıklarının gelişiminde bağırsak florasının rolünü işaret etmekte ve dolayısıyla insanda böyle hastalıkların etiyolojisinde

rol oynayabilen flora üyelerinin konukçudaki kompozisyonunun belirlenmesi ve normal bir bireyde “sağlıklı” floranın yoğunluk ve çeşitlilik bakımından nasıl bir kimliğe sahip olduğunun anlaşılması önemlidir (Backhed ve ark. 2005, Dumas ve ark. 2006, Penders ve ark. 2007, Kinross ve ark. 2008, Mazmanian ve ark. 2008, Wen ve ark. 2008).

Birçok epidemiyolojik çalışma, patolojik veri, genetik ve deneysel bulgu mikroorganizmaların Crohn hastalığının patojenezindeki rolünü desteklemektedir. Hastalığın gelişiminde intestinal floranın rolü ile ilgili birkaç bulgu mevcuttur. Bunlardan biri Crohn hastalarında cerrahi müdahaleden sonra terminal ileumun luminal içerikle temasının artmış inflamasyonla sonuçlanması; ancak fekal akım başka bir tarafa yönlendirildiğinde bu bölgelerde iyileşme belirtilerinin gözlenmesidir. (Rutgeerts ve ark. 1991). Diğer, bazı Crohn hastalarında antibiyotik tedavisinin olumlu sonuç vermesi ve çoklu hayvan deneylerinde antibiyotik muamelesini takiben ülserasyon belirtilerinin azalması ve ayrıca germ-free hayvanlarda kolit bulgularına rastlanılmamasıdır (Sartor 2008).

Ayrıca bu hastalığın infeksiyöz etiyolojisini açıklamada birbirinden bağımsız üç genel bulgu üzerinde durulmaktadır; Bunlardan ilki faydalı ve zararlı bakteriyel kompozisyon arasında meydana gelen uyumsuzluktur. Crohn hastalarında mukoza ilişkili bakterilerin çeşitliliği azalıp genelde patojen bakterilerin yoğunluğu artarken; komensal bakterilerin yoğunluğunda bir azalma gözlenmiştir. Diğer bozuk immün cevap ve intestinal bariyer fonksiyonun neden olduğu yüksek bakteriyel translokasyondur. Sonuncusu ise konukçuya karşı sergilenen patojen sürekliliği ve direngenliğidir (Carrière ve ark. 2014).

İntestinal flora kompozisyonunun Crohn hastalığı ile ilişkisini kapsayan 16S rDNA temelli metagenomik çalışmalar *Fimicutes* ve *Bacteroidetes* familyasına ait birkaç türün kontrollerle karşılaştırıldığında Crohn hastalarında düşüş gösterdiğini ortaya koymuştur (Martinez-Medina ve ark. 2006, Frank ve ark. 2007, Sokol ve ark. 2008, Mondot ve ark. 2011). *Bacteroidetes* miktarındaki azalış inflamasyona katkıda bulunabilir. Keza bu familyaya ait *Bacteroides fragilis* gibi bazı bakterilerin patojen özelliklere sahip komensal bakteri *Helicobacter hepaticus* tarafından indüklenen kolite karşı koruyucu etki gösterdikleri rapor edilmiştir. *Firmicutes* familyası içinde ise *Faecalibacterium prausnitzii*'nin kontrollerle karşılaştırıldığında Crohn hastalarında

miktar olarak azaldığı gözlenmiştir. Fare modellerinde bu türün uygulanmasını takiben anti-inflamatuar etkiler gözlenmiştir (Sokol ve ark. 2008). Dolayısıyla bu türün Crohn hastalarındaki azalmış miktarı intestinal inflamasyona katkıda bulunuyor olabilir. Yine benzer çalışmalarda *Ruminococcus gnavus* ve *Ruminococcus torques* gibi mukolitik bakterilerin de miktar olarak Crohn hastalarında artış gösterdiği gözlenmiştir (Png ve ark. 2010). Diğer taraftan Crohn hastalarının flora kompozisyonu ile ilgili birçok çalışmada *Enterobacteriaceae* familyasının özellikle de *Escherichia coli* türlerinin kontrollerle karşılaştırıldığında görece artmış bir miktara sahip olduğu rapor edilmiştir (Darfeuille-Michaud ve ark. 1998, Neut ve ark. 2002, Swidsinski ve ark. 2002, Darfeuille-Michaud ve ark. 2004, Martin ve ark. 2004, Mylonaki ve ark. 2005, Conte ve ark. 2006, Baumgart ve ark. 2007, Kotlowski ve ark. 2007).

2.1.2. Crohn Hastalarında ve Sağlıklı Bireylerde İntestinal Mukozadaki *E. coli* Lokalizasyonu

E. coli hem Ülseratif kolit hem de Crohn hastalarının intestinal epitelyum hücrelerine yakın konumda bulunan mukus zarında bulunur (Walmsley ve ark. 1998, Swidsinski ve ark. 2005). İntrasellüler *E. coli*, inflamasyonlu mukozada sağlıklı mukozaya oranla daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir (Baumgart ve ark. 2007, Vasquez ve ark. 2007). *E. coli*, FHIS ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak Crohn hastalarında lamina propria'ya dağılmış bir şekilde tespit edilmiştir.

Crohn hastalarında subserozal zar, submukozanın perivasiküler bölgeleri, kas tabakası ve lenf foliküllerinin germinal merkezlerinin yanı sıra hem ekstrasellüler boşlukta hem de makrofajların içinde bu bakteri türüne rastlanılmıştır. Crohn hastalığı tiplerinde *E. coli* yoğunluğunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, ileal Crohn hastalığına sahip bireylerin lenf nodlarında diğer Crohn hastalığı tipleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek bir *E. coli* yoğunluğu saptanmıştır (O'Brien ve ark 2014). İlginç bir şekilde Lazer Capture Mikrodiseksiyon ve PCR temelli bir çalışmada Crohn hastalığına sahip bireylerin granülomalarında sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek oranda *E. coli* DNA'sına rastlanılmıştır (Crohn hastalarında %80 ve Sağlıklı bireylerde %10) (Ryan ve ark. 2002).

2.1.2.1. İltihabi Bağırsak Hastalarından İzole Edilen *E. coli* Irklarının Patojen Özellikleri

İBH'ye sahip bireylerden izole edilen *E. coli* ırklarının her biri ayrı serotiplere ve ayrı DNA sekans tiplerine sahiptir (Baumgart ve ark. 2007, Sepehri ve ark.2009, Dreux ve ark. 2013). İBH hastalarından izole edilen *E. coli* ırkları başlıca ekstra intestinal patojen *E. coli* (ExPEC) ile bağlantılı B2 ve D filogruplarına aittirler. Bazı çalışmalarda İBH hastalarında sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında daha büyük oranda B2 + D filogruplarının kolonizasyonu saptanmıştır ama diğer çalışmalarda bu oranın hem İBH hastalarında hem de sağlıklı kontrollerde benzer olduğu bulunmuştur (Landers ve ark. 2002, Sepehri ve ark. 2009, Martinez-Medina ve ark. 2011, Sepehri ve ark.2011, Elliot ve ark. 2013). Çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçlar analiz edilen örnek tipinin farklılığından ileri geliyor olabilir. Çünkü intestinal sistemde geçici olarak bulunan *E. coli* (daha çok feçeste rastlanılan ırk) A ve B1 filogrubuna aitken, kalıcı *E. coli* (daha çok mukozada rastlanılan ırk) B2 ve D filogrubuna aittir. Bu yüzden mukozal örneklerle yapılan çalışmalarda B2 ve D gruplarına daha çok rastlanılır. Bir diğer neden, hastalık şiddetinin her hastada farklı bir seyirde olmasından ileri gelmektedir. Keza aktif fazda bulunan İBH hastalarında B2 ve D izolatları daha sık bulunur. Yani bu gruptaki *E. coli* izolatları, inflamasyonlu dokulara daha iyi adapte olmaktadır (Nowrouzian ve ark. 2006).

İBH hastalarından izole edilen *E. coli* ırkları ExPEC ırklarına özgü farklı birtakım virulens genlerine sahiptir. Oysa intestinal patojenik *E. coli* ırklarının, kendine özgü virulens genleri ya çok nadirdir ya da hiç yoktur (Schultsz ve ark. 1997, Baumgart ve ark. 2007, Kotlowski ve ark. 2007, Martinez-Medina ve ark. 2009, Sepehri ve ark.2011, Petersen ve ark. 2009, Schippa ve ark. 2009, Elliott ve ark. 2013). Sağlıklı bireylerden de elde edilen *E. coli*'lerde bile bulunan bu virulens faktörlerin intestinal mukozaya tutunmak için gereken 'kolonizasyon faktörleri' olduğu düşünülmektedir (Nowrouzian ve ark. 2001). Virulens gen profilleri ırkların filogenetik orijini ile sıkı bir ilişki içindedir. ExPEC ırkına karakteristik olan virulens ilişkili genler, sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında İBH hastalarında daha yoğun bir şekilde bulunur (Martinez-Medina ve ark. 2009, Dreux ve ark. 2013). Örneğin diyare ilişkili cell-detaching *E. coli* (CDEC) diye isimlendirilen ve hemolizin, sitotoksik nekroz faktör 1, pilus P ve S-fimbria genlerine sahip bu hemolitik *E. coli* türü, Crohn hastalığına sahip

bireylerde total *E. coli* ırkları içinde % 4.7 oranında bulunur. Buna karşın Ülseratif kolit taşıyan hastalarda total *E. coli* ırkları içindeki oranı %24'tür (Curová ve ark. 2009). Diğer bir çalışmada üropatik-spesifik proteinini kodlayan *usp* geni Ülseratif kolit hastalarından izole edilen *E. coli*'lerde Crohn hastalarından izole edilen *E. coli*'lere nazaran daha yoğun bir şekilde bulunmuştur (Sepehri ve ark. 2011).

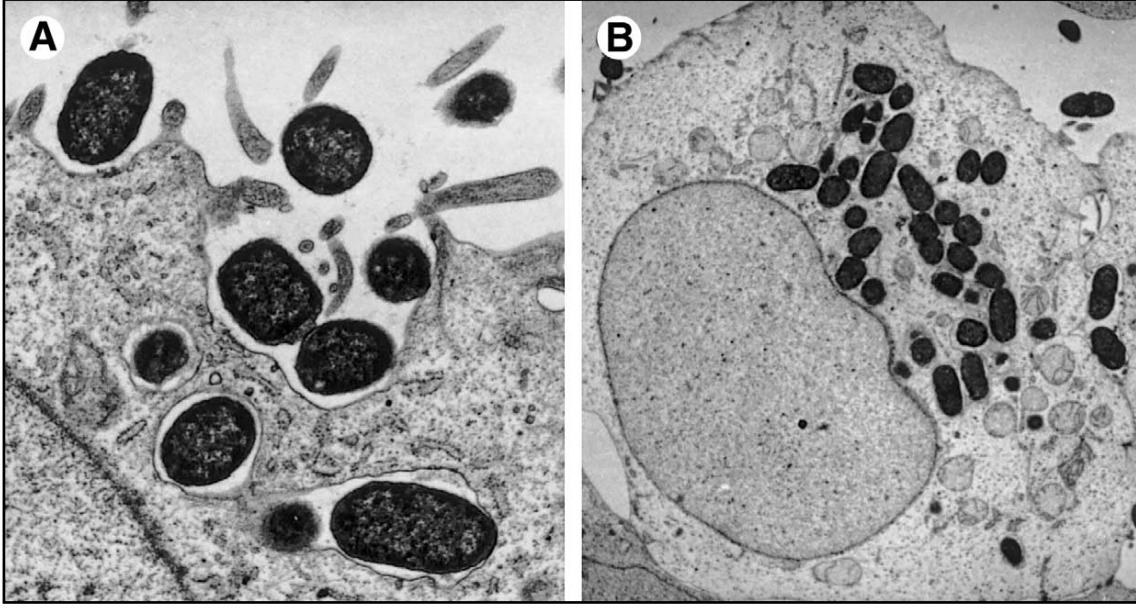
Diğer taraftan, yaklaşık on yıl önce Darfeuille-Michaud ve ark. ayırıcı fenotipik patojen özellikleri Crohn hastalığı ile ilişkili olan ve adherent-invasive *E. coli* (AIEC) olarak adlandırılan yeni bir patotip keşfetmişlerdir (Darfeuille-Michaud ve ark. 2004).

2.1.2.2. Adherent- Invasive *E. coli* (AIEC)

Şu ana kadar Crohn hastalığına genetik olarak yatkın bireylerde spesifik hasara neden olan en olası ırk AIEC'tir.

-AIEC'in Tarifi

AIEC patotipi, farklılaşmış Caco-2 ve/veya farklılaşmamış I-407 intestinal epitelyum hücrelerine hücre başına 1 bakteriye eşit ya da hücre başına bir bakteriden daha fazla bir adezyon indeksi ile yapışabilen; I-407 hücrelerini %0.1'lik orijinal inoküluma eşit ya da %0.1'lik orijinal inokülumdan daha fazla bir invazyon indeksi ile invaze edebilen (Şekil 2.7.); konukçu hücrelerde aktin ve mikrotübül polimerizasyonuna neden olan; invaziv determinantları bilinmeyen; ve J774-A1 makrofajlarında canlı kalıp replike olabilen bir *E. coli* ırkıdır. Tarif edildiğinden beri bazı AIEC ırklarında ExPEC ırkına özgü bazı invaziv determinantlar saptanmıştır ancak bu invaziv faktörler düzenli olarak tüm AIEC ırklarında saptanmamıştır. Dolayısıyla bu invaziv determinantlar özel AIEC patotipleri değildir (Baumgart ve ark. 2007, Martinez-Medina ve ark. 2009, Elliott ve ark. 2013, Rolhion ve ark. 2010).



Şekil 2.7. AIEC, LF82 ırkıtaraından enfekte edilmiş I-407 (farklılaşmamış intestinal epitelyum hücre hattı) epitel hücrelerinin transmisyon elektron mikrografi. (A) 3 saatlik enfeksiyon periyodundan sonra enfekte epitel hücrelerinin uzamış mikrovillusları tarafından sarılmış bakterilerin görünümü. Büyütme: x13,300. (B) 5 saatlik enfeksiyon periyodundan sonra sayısız intraselüler bakterinin görünümü. Büyütme: x4,500(Darfeuille-Michaud ve ark. 2004)

-AIEC Patojenitesinin Moleküler Temeli

AIEC'in patojen mekanizması ile ilgili başlıca çalışmalar referans AIEC ırkı LF82 üzerinden yürütülmektedir ve özellikleri Crohn hastalığı patojenezinin birçok özelliği ile bağlantılıdır.

Bu ırkın intestinal epitelyum hücrelerine yapışmasına (adezyonuna), epitelyum hücre yüzeyinde bulunan mannoz-benzeri bir şeker barındıran glikoprotein CEACAM6 reseptörleri ile etkileşime geçen Type-1 pili aracılık eder (Barnich ve ark. 2007, Carvalho ve ark. 2009). CEACAM6 Crohn hastalığının ileal tipine sahip hastalarda aşırı derecede ifade edilir ki bu da hastaları AIEC in aşırı lokalizasyonuna daha duyarlı hale getirir. Type-1 pili, patojen olmayan ırklar da dahil tüm *E. coli* bakterilerinde mevcut olmasına rağmen, son çalışmalar AIEC ırklarında bakterinin epitelyum hücrelerine daha etkili bağlanmasını sağlayan FimH adhesin varyantlarının varlığını ortaya çıkarmıştır (Dreux ve ark. 2013).

Flagella da bu ırkın intestinal epitelyum hücrelerine adezyonu ve invazyonu için önemlidir, ve bu farklılaşmış epitelyum hücrelerinde proinflamatuvar sitokin IL-8 sekresyonunu yükseltir ki bu da enfeksiyon bölgesinde makrofaj ve dentritik hücre yığılmasına yol açar (Eaves-Pyles ve ark. 2008, Subramanian ve ark. 2008).

Diğer salgılar lenfositler ve makrofajlar tarafından salınan $INF\gamma$ (Interferon gama) ve $TNF\alpha$ 'dır. Bu salgılar AIEC'in invazyonunda ve CEACAM6'nin ekspresyonunda artışa yol açar. İntestinal epitelyum hücrelerinde, LF82'ye ait Type-1 pilinin CEACAM6 reseptörlerine, flagellanın da TLR5 (Tool Like Receptor-5) reseptörlerine bağlanması HIF-1 (Hypoxia-İnducible Factor -1) üretimini ve klasik NF- $K\beta$ yolağını indükler. Neticede bu moleküller, IL-8'in ve pro-anjiogenik faktörlerin transkripsiyonunu ortaklaşa bir şekilde kontrol eder (Mimouna ark. 2011).

Bu alanda yürütülen diğer bazı çalışmalar mezenşimal hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen ara filament Vimentin'inin LF82'nin reseptörü olarak davrandığını öne sürmektedir. İntraselüler bölgede vimentinin lösince zengin tekrarları bu proteinin plazma membranında yığılmasına yol açan, NOD2 ile etkileşir. Bu proses NOD2'nin antijen tanıma, NF- $K\beta$ aktivasyonu ve otofaji indüksiyonu gibi fonksiyonlar için gereklidir. Ancak Crohn hastaları NOD2'nin vimentin ile etkileşmesine engel teşkil eden spesifik variantlara (L1007 fs ve R720W) sahiptir ve neticede NOD2'ler sitozolde lokalize halde kalırlar. Bu durum defektif inflamasyon cevabına, otofaji indüksiyonuna ve Crohn hastalarının epitelyum hücrelerinde AIEC birikimine yol açar. NOD2 ve vimentin birlikte, AIEC'in kolonizasyonunda önemli bir role sahip olabilir (Stevens ve ark. 2013).

Son dönemde konukçu-mikroorganizma etkileşiminde Kitinaz enziminin rolü de tartışılmaktadır. Doğada selülozdan sonra en bol bulunan polisakkarid olan kitin; böcekler, mantarlar ve kabuklular gibi yaşayan birçok organizmanın yapısında bulunur. Ancak insanda yapısal eleman olarak kitin bulunmaz. Dolayısıyla kitinaz enziminin de insanda aktif olarak sentezlenmediği düşünülmektedir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalarda fare ve insanlarda glikozid hidrolaz 18 ailesine ait bir dizi kitinazın varlığı saptanmıştır. Memeli kitinaz ve kitinaz benzeri bu proteinler; kitinaz 3-like-1 (CHI3L1), Kitotriosidaz, kitinaz 3-like-2 (CHI3L2), kitinaz 3-like-3 (CHI3L3), Asidik memeli kitinazı (AMCase), Oviduct-specific glycoproteins ve Stabilin-1 interacting chitinase-like proteindir (SI-CLP). Kitotriosidaz ve AMCase enzimatik aktiviteye sahipken diğerleri enzimatik olarak inaktiftir. Bunlardan CHI3L1 enzimatik aktiviteye sahip olmamasına rağmen hala kitin ve kito oligosakkaridlere yüksek affiniteyle bağlanabilmektedir. İlginç bir şekilde inflamasyon sırasında insan kitinazı intestinal kolon epitelinde aşırı derecede eksprese olur ve kitinaz ailesinin bu üyesi inflamasyon

sırasında patojen veya potansiyel patojen bakterilerin kolon epitel hücrelerine adezyon ve invazyonunu arttırmaktadır. Bu bağlamda CHI3L1'in bakteriyel kolonizasyonu nasıl arttırdığı ile ilgili bir dizi çalışma mevcuttur. Patojen bakterilerin birçoğu kitinaz aktivitesine sahiptir ve kitin polisakkaritine ulaşmalarını sağlayan kitin bağlayıcı protein (CBP21), sentezlerler. Yapılan çalışmalar bakteriyel CBP21'in kolon epitel hücrelerine direk CHI3L1 üzerinden değil, bu inaktif enzim tarafından bağlanan endojen kitin benzeri moleküller aracılığı ile bağlanabileceğini işaret etmektedir (Kawada ve ark. 2008). CHI3L1 yukarıda da belirtildiği gibi Crohn hastalığını da kapsayan iltihabi bağırsak hastalıklarında insan kolon hücresinde inflamasyon sırasında aşırı derecede sentezlenir. LF82 ile yapılan bir çalışmada SW480 hücre hattında glikozillenmiş CHI3L1'in, bakterilerin adezyon ve invazyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada LF82 ile enfekte farelerin kontrollerle karşılaştırıldığında kolon epitel hücrelerinde yüksek seviyede CHI3L1 proteinine rastlanılmıştır. Diğer taraftan uzmanlar LF82'ye özgü iki kitin bağlama domeininde spesifik polimorfizimler saptamıştır (Low ve ark. 2013).

Transmembran protein OmpA'yı içeren dış membran vezikülleri (outer membran vesicles, OMVs) LF82'nin intestinal epitelyum hücrelerini invaze etmesinde rol oynar. OmpA, endoplazmik retikulumda lokalize ve Crohn hastalarının ileal epitelyum hücrelerinin apikal yüzeyinde aşırı derecede eksprese olan stress proteini şaperon Gp96'ya bağlanır. OMVs konukçu hücre ile kaynaşır ve hala tanımlanamamış bakteriyel efektörlerin salınımının invazyon sırasında aktin polimerizasyonuna ve mikrotübül yığılmasına neden olduğu düşünülmektedir. LF82 ve diğer B2 ırklarının ompA sekanslarındaki nokta mutasyonları Gp96 ile daha güçlü bir etkileşime aracılık eder. Neticede Gp96 şaperonu Crohn hastalarının ileumunda aşırı derecede eksprese olur ki bu da onları AIEC enfeksiyonuna daha duyarlı hale getirir (Miquel ve ark. 2010, Rolhion ve ark. 2010).

LF82, konukçu hücrenin içinde birkaç değişik hücre içi kompartımda bulunabilir. LF82'nin tek başına veya gruplar halinde bulunabildiği bu bölgeler; tek membran kofulları, zarar görmüş kofullar, otofajinin sınırlandığı intraselüler LF82 subpopulasyonunu bulunduran LC-3 pozitif otofagozomlardır. Son dönemde LF82'nin otofajik prosesi ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir. İntraselüler LF82, T84 hücrelerinde ve fare enterositlerinde MIR30C ve MIR130'un ekspresyonunun artışına

yol açan NF- κ B yolağını aktive eder ve ATG5 ve ATG16L1 seviyelerini düşüren bu microRNAs lardaki uyarılma otofajinin inhibisyonuna ve inflamasyon cevabının artışına yol açar. Neticede ATG16L1 ve IRGM genleri ile ilişkilendirilen otofaji mekanizmasındaki defekt Crohn hastaları ile bağlantılıdır ve bu defektler AIEC'nin insan hücreleri içinde sağ kalmasına bir avantaj sağlar. Onun için bu süreç, konukçudaki defekler ve intraselüler *E. coli*'nin yaşamasını sağlayan AIEC patojenitesinin bir kombinasyonu şeklinde gerçekleşir (Lapaquette ve ark. 2010).

Ek olarak, adezyon ve invazyon kapasitesine sahip LF82, M hücreleri yardımıyla Peyer plaklarına (Pp) ve lamina propriaya geçebilir. Bu etkileşim M hücrelerine özgü bir yüzey glikoproteini olan GP2 ile bağımsız bir şekilde etkileşebilen Long polar fimria (Lpf) ve Type-1 pili aracılığıyla gerçekleşir. Unutulmamalıdır ki Crohn hastalığında inflamasyon başlangıç bölgeleri Pp ve kolonik lenfoid foliküllerdir; dolayısıyla translokasyon mekanizması hastalığın erken klinik bulguları ile tutarlıdır (Terahara ve ark. 2008, Hase ve ark. 2009).

Bakteriyel translokasyonu kolaylaştıran bir diğer mekanizma, LF82'nin intestinal geçirgenliği değiştirme kabiliyetidir. Bunu por oluşturan endojen hücre-hücre sıkı bağlantı (tight junction) proteini Claudin-2'nin sentezine yol açarak yapar. Bir tıkalı kavşak proteini olan ZO-1 (Zonula occludens-1) ve çıpalayıcı kavşak proteini E-kaderin (Epitelyal Kaderin)'lerin apikal bağlantılardan uzaklaşması, transepitelyal direncin azalmasına ve bariyer fonksiyonun kaybına yol açar. Bunun yanında TNF α gibi proinflatuvar sitokinler de intestinal permeabilityi değiştirebilir. AIEC infeksiyonu büyük miktarda TNF α ve IL-8 sekresyonunu indüklediğinden LF82'nin indüklediği bariyer fonksiyon kaybının bu türüne TNF α 'nın indüksiyonunun aracılık ettiği söylenebilir (Sasaki ve ark. 2007, Wine ve ark. 2009).

LF82 ve diğer iki AIEC ırkında (O83:H1 ve UM146) gözlenen yeni bir patojenite mekanizması, intestinal epitelyum hücrelerinde IFN γ yolağının subversiyonu yoluyla konukçu immun cevaptan kaçmadır. Bu patojenite mekanizmasında sinyal iletilicilerinin fosforilasyonu ve transkripsiyon aktivatörü olan STAT-1 bloke edilir, böylece IFN γ -bağımlı genlerin transkripsiyonu engellenir ki bu da konukçu immun cevabı azaltır ve gerekli miktardaki anti-mikrobiyal cevabın yetersizliği ile sonuçlanır (Ossa ve ark. 2013).

Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) ırkının shiga toksini, IFN γ stimulasyonundan sonra tirozin fosforilasyonu ve STAT1 aktivasyonunu bloke edebilir. Aksine enteropatojenik *E.coli* E2348/69 ya da komensal *E. coli* HB101'de bu patojenite mekanizması mevcut değildir. Bununla birlikte AIEC'de shiga toksini mevcut değildir ancak AIEC'deki bu patojen mekanizmadan küçük bir salgı proteinin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Ossa ve ark. 2013).

AIEC ırkı, LF82 lamina propria'ya ulaştıktan sonra bu bakteri makrofajlar tarafından sarılır. Makrofajların içine alınan LF82 stoplazmaya kaçamaz ancak lizozomlarla kaynaşan büyük bir kofulun oluşumunu indükler. AIEC bakterisi antimikrobiyal bileşikler, proteolitik enzimler, asidik pH ve oksidatif strese sahip bir ortamda replike olabilme kabiliyetine sahiptir. Aslında in-vitro çalışmalar asidik ortamın, AIEC LF82 bakterisinin replikasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (Bringer ve ark. 2006). Proteaz HtrA ve Tiyol-disülfid oksidoredüktaz DsbA'nın, makrofajlar içinde canlı kalma ve replikasyon için önemli olduğu rapor edilmiştir. Uzmanlar bu proteinleri LF82'nin stres koşullarına dirençli olmasıyla bağlantılı bulmuşlar keza bu proteinlerin isojenik mutantları asidik şartlarda ve besince fakir ortamlarda etkili bir şekilde gelişemezler. Bu proteinler hem LF82'nin makrofajları enfeksiyonu sırasında hem de besince fakir asidik koşullarda aşırı derecede eksprese olurlar. İlginç bir şekilde HtrA'nın aşırı derecede ekspresyonu LF82'ye has bir durumdur. Keza patojen olamayan *E. coli* ırkları benzer ortamlarda bu proteini aşırı derecede eksprese etmezler. Gen ekspresyonunun temel posttranskripsiyonel regülatörü RNA-bağlayıcı protein Hfq da makrofajlar içinde canlı kalmada ve replikasyonda önemli görülmektedir ve stres koşullarına tolerans da adezyon ve invazyon gibi LF82'nin diğer patojen özelliklerindendir. Hfq regülatörü küçük RNA moleküllerine bağlanarak onların mRNA ile etkileşimini kolaylaştırır ancak hedef genlerin hangileri olduğu hala bilinmemektedir (Bringer ve ark. 2007).

LF82'nin makrofajlar içindeki sürekli replikasyonu hücre ölümü olmaksızın yüksek seviyede TNF α salınımı ile sonuçlanır (Glasser ve ark. 2001). Bu Crohn hastalarında granüloma oluşumunu ve inflamasyon cevabının nedenini açıklayabilir ve bu in-vitro çalışmalarla da gösterilmiştir (Meconi ve ark. 2007, Carvalho ve ark. 2008, Carvalho ve ark. 2009). LF82'nin infekte makrofajlarda ve dendritik hücrelerde apoptosisi ertelemedeki rolü son dönemde rapor edilmiştir. LF82 enfeksiyonunun

Kaspaz-3 fonksiyonunu değiştirdiği ve bu molekülün proteozomda parçalanmasını arttırdığı saptanmıştır. Kaspaz-3, apoptosiste önemli bir rolü olan bir proteazdır (Dunne ve ark. 2013).

LF82 aynı zamanda Crohn hastalarından izole edilen monositlerde de enfeksiyondan sonraki yirmi saat boyunca replike olabilme kabiliyetine sahiptir ancak daha sonra bu monositler intraselüler bakterileri temizlemeye başlar (Peeters ve ark. 2007). İlginç bir şekilde CARD15 gen polimorfizmine (R702W, G908R ve 1007fs) sahip hastalar, AIEC enfeksiyonuna karşı düşük IL1 β , IL-6 ve IL-10 seviyelerinde azalmış bir inflamasyon cevabı oluşturur. Aksine TRL4'teki Asp299Gly mutasyonu AIEC karşı oluşan monosit cevabında herhangi bir etkiye sahip değildir. Bununla birlikte bir çalışmada Crohn hastalığında monosit-türevli ve lipopolisakkaridlerle stimüle olmuş dentritik hücrelerin düşük IL1 β ve IL-6 seviyelerinde azalmış bir inflamasyon cevabı görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada bir otofaji marker proteini olan LC3'ün azalmış ekspresyonu ile birlikte, bozulmuş bir otofaji prosesi saptanmıştır. Ayrıca uzmanlar Crohn hastalarında mukozal Th17 aktivasyonunun doğal bağışıklıktaki defektten kaynaklı zayıf bakteriyel kleranstan ikincil derecede sorumlu olduğunu öne sürmektedir (Nieminen ve ark. 2014).

AIEC bakterisi aynı zamanda insan nötrofillerini de invade edip içlerinde replike olabilir ancak makrofajlar ve intestinal epitelyum hücreleri içindeki davranışlarının aksine LF82 infekte nötrofiller içinde sonradan alternatif bir hücre ölüm prosesi olan NETosis'e girmek üzere otofajiyi indükler Netosis, Nekrosis ve Apoptosis'ten farklı spesifik bir hücre ölüm şeklidir fakat mekanizması hala net olarak anlaşılabilmiş değildir (Chargui ve ark. 2012). Nötrofillerde LF82, otolizozomlarda lokalize olur. İnfekte nötrofiller sitokin salgılar özellikle de mukozal inflamasyona katkıda bulunan IL-8'i salgılarlar.

Diğer taraftan patojenik bir özellik olan biyofilm oluşturma AIEC ırklarında sıkça karşılaşılan bir durumdur. Bir çalışmada 27 AIEC ırkından 17'sinin; 38 non-AIEC ırkından da sadece 9'unun biyofilm oluşturabildiği saptanmıştır (Martinez-Medina ve ark. 2009). Hareketlilik ve flagellalar biyofilm oluşumunda önemli bir role sahiptir. Hareketsiz ırklar biyofilm oluşturamazken, H1 antijenine sahip tüm ırklar güçlü bir şekilde biyofilm oluştururlar. Son zamanlarda Chassing ve ark. LF82 ırkının, hücre

kültürü ve hayvan modellerinde kullanılan intestinal epitelyum hücreleri üzerinde biyofilm oluşturabildiğini göstermişlerdir (Chassaing ve ark. 2013).

-AIEC Irklarının Patojenitesiyle İlgili Özgün Genetik Faktörler

AIEC'in patojenitesi ile ilgili yapılan onca araştırmaya rağmen, AIEC patojenitesinin karakteristik genetik faktörleri hala bilinmemektedir. Patojenitesi ile ilgili genlerin büyük çoğunluğu AIEC'e özgü değildir. Keza *FimH*, *ompA*, *dsbA* ya da *htrA* gibi patojenite ilişkili genler non-patojenik ırklarda da dahil *E. coli* ırklarının büyük bir çoğunluğunda mevcuttur (Bringer ve ark. 2005, Bringer ve ark. 2007, Rolhion ve ark. 2010, Dreux ve ark. 2013). Meydana gelen nokta mutasyonları ya da farklılaşmış gen ekspresyonları AIEC ırklarının artmış uyum ve/veya virülensi ile ilgilidir. Diğer taraftan genellikle non-patojenik *E. coli*'lerde bulunmayan *afaC*, *pks* ya da *lpf* gibi virülens genler, AIEC ırklarında sıklıkla bulunmakta ancak düzenli bir şekilde tüm AIEC'lerde bulunmamaktadır (Martinez-Medina ve ark. 2009, Chassaing ve ark. 2011, Prorok-Hamon ve ark. 2014). AIEC'ler klonal olarak farklıdır; farklı serotipleri vardır ve her bir grup, ExPEC ırklarına ait virülens genlerinin farklı setlerini taşır. Bu özellikler ExPEC benzeri non-AIEC ırkları için de geçerlidir. AIEC; patotiplerine spesifik, genetik faktörlerin saptanmasını zorlaştıran yüksek bir genotip çeşitliliğine sahiptir.

Dikkat edilmesi gerekir ki AIEC ve ExPEC arasındaki genetik benzerliğe rağmen, ExPEC genellikle AIEC fenotipini yansıtmaz. Bir çalışmada farklı kaynaklardan 63 ExPEC ırkından sadece 4'ü AIEC-benzer çıkmıştır. Son dönemde genom ve transkriptom temelli çalışmalarla AIEC patojenitesinde yer alması oldukça muhtemel ek genetik faktörlerin ya da anahtar genlerin farklılaşmış ekspresyonunun saptanması önemli bir dönüm noktasıdır (Martinez-Medina ve ark. 2009).

Şimdiye kadar B2 filogrubuna ait dört AIEC genomu sekanslanıp yayımlanmıştır (Miquel ve ark. 2010, Nash ve ark. 2010, Clarke ve ark. 2011, Krause ve ark. 2011) ve LF82 ve NRG857c ırklarının karşılaştırmalı genomik analizi yapılmıştır. PCR genotiplemesiyle daha önce bilinmeyen Type-6 secretion gibi yeni virülens genler saptanmıştır. AIEC'e özgü sekanslar LF82 ve NRG857c arasında sıklıkla tespit edilmiştir. Bununla birlikte her iki ırk onların genetik olarak çok yakın olduğunu gösteren aynı serotipe (B2O83:H1) ve filogruba aittir. Diğer taraftan bu

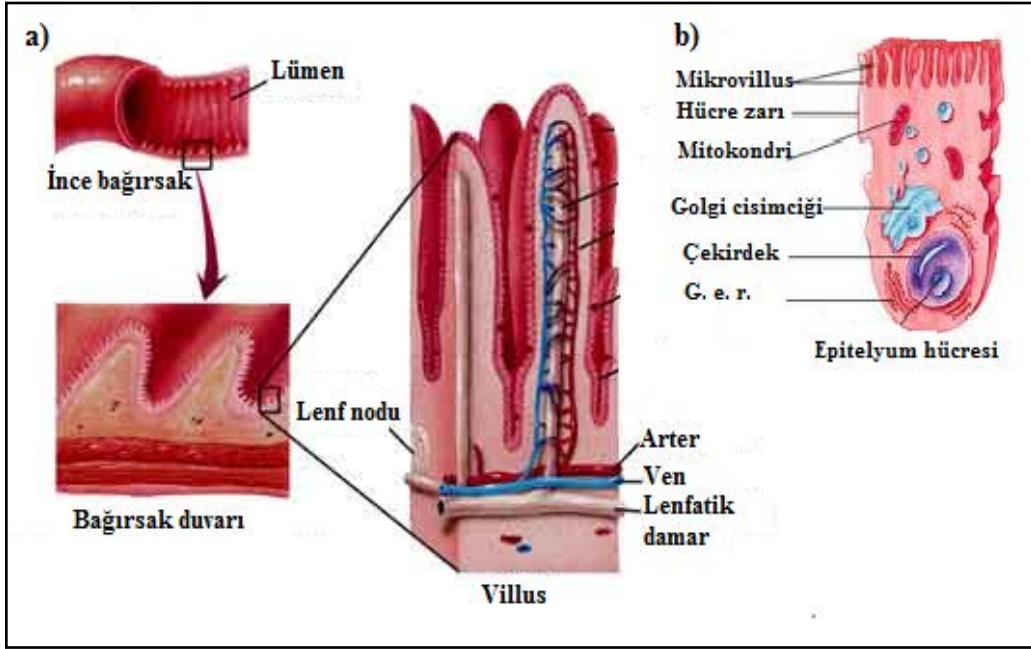
genlerin dağılımını diğer AIEC ırklarında da çalışmak bu genlerin patotipe mi özgü yoksa strain-spesifik olduğunu doğrulamak adına oldukça önemlidir (Nash ve ark. 2010).

2.2. İntestinal Flora Üyelerinin Barındığı Bağırsak Sistemine Genel Bir Bakış

2.2.1. İnce Bağırsak

Gastrointestinal sistemde besinlerin sindirim ve emiliminin gerçekleştirildiği incebağırsak; duodenum, jejunum ve ileumdan oluşur. Sindirim sisteminin en önemli bileşenlerinden olan ince bağırsağın uzunluğu yaklaşık 5 m'dir. Bu uzunluğun 3/5 'i ilium, 2/5'i duodenum ve jejunum tarafından oluşturulur. Bu uzunluğuna karşın incebağırsak yaklaşık 200-400 m²'lik bir yüzey alanına sahiptir. Yüzey alanındaki bu genişlik intestinal mukaza katlantıları, villuslar ve mikrovillusların varlığından ileri gelmektedir. Villuslar intestinal epitelyum hücre tabakasının ince bağırsak lumenine doğru çıkıntı yaparak oluşturduğu uzantılardır, villuslara göre çok daha küçük boyuttaki mikrovillüsler ise yaklaşık 1 µm uzunluğunda 0.1 µm çapında olup intestinal epitelyum hücrelerinin apikal kısımlarının uzantılarıdır (Şekil 2.8.) (Junquera ve ark. 1989, Ganong 2003). İnce bağırsak hücreleri başlıca 4 gruba ayrılır. Bunlar enterositler, goblet hücreleri, paneth hücreleri ve endokrin hücrelerdir. İnce bağırsak epitelyum hücrelerinin büyük çoğunluğu (%95) enterositlerden oluşur. Enterositlerin mikrovillüsleri içinde; hidrolaz, peptidaz gibi enzimler, transport proteinler ve çeşitli ligandlar için birtakım almaçlar bulunur. Besinlerin emilimi için gereken enerji enterositlerin bazolateral membranında yer alan Na-K pompası (Na⁺/K⁺ - ATPase) aracılığıyla sağlanır. İnce bağırsakta emilimin gerçekleştirildiği yer villuslar iken, antimikrobiyal peptitler veya musin gibi salgılar kriptlerde yerleşen özelleşmiş hücreler tarafından üretilir. Bu enterositlerin salgı yapamadığı anlamına gelmez. İnce bağırsakta baskın olay emilim olduğu halde bazı patolojik durumlarda immun yanıt tetiklendiğinde sekresyon ön plana çıkabilir. Bakteriyel toksinler, sitokinler, safra tuzları, prostoglandinler ve/veya bazı hormonlar sekresyonu uyarabilir. Goblet hücrelerinden musin sekresyonu yapılırken, enteroendokrin hücreler, peptid hormonlar ve parakrin maddeler sekrete ederler. Paneth hücreleri kriptlerin dip kısmında yer alır ve lizozim ve defensin gibi maddeler

salgılayarak mukozanın korunmasına katkı sunarlar (Kumar ve Clark 2001, Ganong 2003).



Şekil 2.8. İnce bağırsak villus yapısının şematik olarak gösterimi. **a)** Bağırsak lümeni içine doğru uzanan villus yapısı. **b)** İntestinal epitelyum hücresi ve onun apikal bölgesindeki mikrovillus yapısı (Anonim 2016_c)

Bağırsıklık sisteminin birincil savunma hattının bir bileşeni olan bağırsak mukozası fiziksel bir bariyer görevi görür. İntestinal epitelyum hücre hattını virüsler, bakteriler ve gıda proteinleri gibi birçok antijene karşı korur. İnce bağırsağın lenfoid dokusu (Gut-associated lymphoid tissue, GALT), lamina propria ve epitel içinde yer alan hücresel birimlerden meydana gelir. Lamina propria vücutta yer alan gastrointestinal boşluk, solunum boşluğu ve ürogenital boşluk gibi kanallarda yer alan epitelyum hücrelerinin altında uzanmış olan gevşek bir dokudur. Gevşek olduğu için hücre çeşidi bakımından zengin bir repertuvara sahiptir. Plazma hücreleri, fibroblastlar, lenfositler makrofajlar, azinofiller, lökositler ve mast hücreleri gibi birçok hücre tipini bünyesinde barındırır. Lamina propria aynı zamanda mukus gibi sıvıları salgılayan bez hücrelerine de sahiptir ve epitelyum hücreleri ile birlikte mukoz memranı oluşturur (Kumar ve Clark 2001, Anonim 2016_b). GALT antijenlere karşı lokal immun cevap oluşturabilir, bazı durumlarda savunmaya katkıda bulunan lokal immun yanıt, bazen de hipersensitivite reaksiyonlarına yol açarak mukoza harabiyeti yaratır. İnek sütü allerjisi hipersensitivite reaksiyonuna örnek olarak verilebilir. Çevresel lenfoid organlardan biri

de ince bağırsakta konumlanmıştır. İnce bağırsak boyunca Peyer plakları (Pp) adı verilen lenfoid doku bölgeleri bulunur. Bağırsak lumeninden antijenlerin mukozaya girişi, Pp içinde yer alan bir tür epitel hücresi üzerinden gerçekleşir. Bu özel epitel hücresine M hücresi denir. Bağırsak lümenindeki antijenlerin saptanması ise lamina propriada bulunan dendritik hücrelerin dendritlerini, intestinal epitelyum hücrelerini bir arada tutan tıkayıcı kavşakların arasından bağırsak lümenine uzatması yoluyla yapılır. Epitelin altında yerleşmiş olan lenfositlerin herhangi bir antijen ile stimule olmasından sonra bu lenfositler lokal mezenterik lenf nodlarına, oradan da torasik duktusa giderler ve dolaşıma geçerler. Bir süre sonra uyarılmış lenfositler bağırsak mukozasına immunglobulin üreten plazma hücreleri şeklinde geri dönerler. IgM, IgE, IgG, IgD ve IgA olmak üzere başlıca immünoglobulinlerin 5 sınıfı olmasına rağmen sağlıklı bir bireyde intestinal sistemde salgılanan baskın immunglobulin IgA'dır. Salgılanan IgA epitelyum hücrelerinden geçerek luminal antijenler ve bakterilerin tutulduğu mukus zarında alıkonur. İntestinal epitelyuma tutunmuş ya da lümende bulunan bakteriler, Pp'de bulunan B hücrelerini uyaran dendritik hücreler tarafından saptanırlar. Nihayetinde bu da spesifik IgA sekresyonuyla sonuçlanır (Harvey 2013).

2.2.2. Kalın Bağırsak

Karın boşluğunun büyük bölümü ince bağırsak tarafından doldurulmuştur. Kalın bağırsak, ancak bir çerçeve gibi bu yapıyı dışarıdan kuşatacak şekilde yer alır. Kalın barsağın toplam uzunluğu yaklaşık 120-150 cm kadardır. Çekum, kolon ve rektum olmak üzere üç bölümde incelenir. Kolon yapısal olarak ince bağırsaktan farklı bazı özellikler sergiler. Mesela kolonun lümen kısmında vili yapıları bulunmaz. Ayrıca kolonun dış yüzeyi ince bağırsaktan farklı olarak girintili çıkıntılıdır. Kolonun motilitesi de yine ince bağırsaktan daha yavaştır. Kolon, suyun emiliminden ve elektrolit dengesinde, floradaki bakteriler yardımıyla bazı vitaminlerin sentezinden, sindirilmeyen bazı kompleks karbohidrat ve proteinlerin fermentasyon yoluyla parçalanmasından ve feçesin oluşumundan sorumludur.

Kolon intestinal homeostasis korunmasında rol alır keza suyun ve elektrolitlerin transportu kolonda gerçekleştirilir. Kolon, suyun ve elektrolitlerin sekresyonu ve absorpsiyonu işlemi ile uygun hidrasyon ve elektrolit dengesinin sürdürülmesini sağlar. Mukozal yüzeyde bu proses için yaklaşık 2.000 cm²'lik bir yüzey alanı mevcuttur

(Sandle 1998). Kolondaki epitelyum hücre yüzeyleri öncelikli olarak absorbsiyondan sorumlu iken, kript (crypt) hücreler sıvı sekresyonunda rol alır; ancak kript hücrelerin kimi zaman absorbsiyona katkıda bulunduğu da bulunmuştur (Sandle 1998, Bharucha ve Camilleri 2007, Cooke 1991). Kümüs kolona ulaştığında bakteriyel aktiviteyle günlük yaklaşık 200 g feçes üretiminin yanı sıra burada sıvı ve elektrolitlerin sekresyonu ve absorbsiyonu da gerçekleştirilir (Harrel ve Chang 2006).

Sindirim ve absorbsiyon öncelikli olarak mide ve ince bağırsakta meydana gelmesine rağmen, kolon hala bu işlemler için önemli bir rol oynamaktadır. Kolon, ince bağırsaktan gelen ve sindirilememiş çeşitli kompleks karbonhidratları ve sindirim ve absorbsiyona direnç gösteren daha kısa proteinleri bünyesinde barındırır ve bunları ince bağırsağın aksine fermantasyon yolu ile sindirime uğratarak parçalar (Christl ve Scheppach 1997, Rombeau 2003). Fermantasyon sakkarolitik ve proteolitik özelliklere sahip 400 ü aşkın farklı bakteri türü tarafından gerçekleştirilir ve bu bakterilerin büyük çoğunluğunu, kolondaki zorunlu anaeroblar oluşturur (Nordgaard 1998). Sindirilmek üzere ince bağırsaktan geçen karbohidratların yaklaşık %10'u çekuma sindirilmemiş materyal olarak giriş yapar. Başlıca suda çözünebilen bitki artıklarında bulunan bu kompleks karbohidratlar bakteriyel fermantasyon sonucu butirat (%15), propionat (%25) ve asetat (%60) gibi kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürülür. Suda çözünebilen bitkisel lifler ve kompleks karbohidratlarca zengin bir diyetin sindirimi, suda çözünemeyen liflere nazaran daha büyük miktarda kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumuna neden olur (Tazoe ve ark. 2008).

2.3. İntestinal Bağışıklık Sisteminin Birincil Savunma Hattı Bileşenlerinden Mukus ve Özellikleri

Sindirim sistemi boşluğu mide, ince bağırsak ve kolonda farklı özelliklere sahip olmak üzere bir mukus yapısı ile örtülüdür. Bağırsaklarda bulunan ve büyük çoğunluğu glikozillenmiş jel formundaki MUC2 ve midede bulunan MUC5AC mukusun majör komponentleridir. İnce bağırsaktaki mukus, epitelyum hücrelerine ve Peyer plakları'na ulaşabilen bakteri sayısını sınırlar. Kolon yani kalın bağırsak iki mukus zarına sahiptir. Daha içteki mukus zarı komensal bakterileri konukçunun epitelyum hücrelerinden ayırır. Dıştaki mukus zarı ise komensal bakterilerin doğal habitatıdır. İntestinal goblet hücreleri sadece MUC2 musin salgılamaz, aynı zamanda mukusun tipik komponentleri

olan CLCA1, FCGBP, AGR2, ZG16 ve TFF3 gibi biyomolekülleri de salgılar (Hansson ve Johansson 2010).

Koruyucu mukus sisteminin organizasyonu sindirim kanalı boyunca belirgin bir biçimde değişkenlik gösterir. Ağızda, tükürük bezleri tarafından üretilen MUC5B ve MUC7, sindirilmekte olan besinleri özafagustan geçmeleri için kayganlaştırır (Bobek ve ark 1993, Nielsen ve ark 1996, Khan ve ark 1998, Wickstrom ve ark 1998, Thornton ve ark. 1999) . Mide, hücrelere bağlı yoğun iç ve hücrelere bağlı olmayan gevşek dış mukus zarı olmak üzere iki zarlı mukus sistemine sahiptir. Her iki tabaka da superficial epitelyumdan salgılanan MUC5AC musin tarafından oluşturulur (Ho ve ark. 1995, Atuma ve ark. 2001, Nordman ve ark. 2002). Midedeki bezler ve doudenum, jel formu musin MUC6'yı salgırlar. İnce bağırsak, mide ve kolonun aksine yüzey mukusun sadece bir tipini oluşturan MUC2 musini salgılar. Bu mukus hücrelere bağlı değildir ve uzaklaşması kolaydır (Gum ve ark.1994). Son olarak kolon ise yine hücrelere bağlı yoğun iç ve hücrelere bağlı olmayan gevşek dış mukus zarı olmak üzere iki zarlı mukus sistemine sahiptir ve her iki tabaka da MUC2 musin tarafından oluşturulur. Ama aynı musin ince bağırsak ve kolonda farklı davranışlar sergiler (Audie ve ark. 1993, Weiss ve ark. 1996, Hansson ve Johansson 2010).

2.3.1. Musin Domenleri

Mukusta temel yapı taşı; büyük, yüksek oranda glikozillenmiş bir protein olan musindir. Tipik olarak bu musinler %80 oranında karbohidrat içeren ve prolin, serin ve treonin amino asit tekrarlarından oluşan (PTS sekansı olarak anılır) glikoproteinlerdir. Amino asit tekrarları VNTR tekrarları (Variable Number Tandem Repeats) gibidir fakat bu protein önceden belirlenmiş tek bir ekson tarafından kodlanır (Lang ve ark. 2007, Johansson ve ark. 2011). PTS sekansları çok uzun olabilir; örneğin MUC2 musinde yaklaşık 2.300 amino asit uzunluğunda bir portein koru bulunur (Gum ve ark. 1994). Serin ve Treonin amino asitlerinin hidroksil grupları golgi organeli içinde N-asetil galaktoz amin (GalNAc) için bağlanma bölgeleri oluşturur ve her bir peptidil-GlaNAc transferaz hücre ve organ tipine özgüdür (Bennett ve ark. 2012). Daha sonra bu GalNAc residüvleri glikan epitoplarının çok kompleks bir formunu oluşturmak üzere diğer gliko transferazların da etkisiyle uzamaya ve dallanmaya başlar (Larrson ve ark. 2009, Jensen ve ark. 2010). Bir musin domeininin uzunluğu yaklaşık 0.45 µm iken her iki domeinin

toplam uzunluğu 0.55 µm'dir. Musin domenindeki glikanlar birçok su molekülüne bağlanabilir ve bu da musine jel benzeri bir yapı kazandırır (Ambort ve ark.2012).

2.3.1.1. Transmembran Musin

Tüm musinler onlara spesifik özellikler kazandıran domeinlere sahiptir. Transmembran musin, onun hücre membranına bağlanmasını sağlayan bir transmembran domeinine sahiptir. Bu musinler büyük bir N-terminal ve kısa bir stoplazmik C-terminal musin domeinine sahiptir (Hollingsworth ve ark. 2004, Hattrup ve ark. 2008). Bu musinlerin membranın dış tarafında kalan kısmı SEA (Sea urchin-enterokinaz-agrin domeini (MUC1, MUC3, MUC12, MUC13 ve MUC17 musin türlerini içerir) ve sadece MUC4 musinden oluşan başka bir domeine sahiptir. Şaşırtıcı bir şekilde bu domeinlerin ikisi de biyosentez sırasında kesilir ancak non-kovalent etkileşimler yardımıyla bir arada dururlar Bu yapı β-plakalı sekonder protein yapısıdır ve mekanik bir stresle hücre zarına ciddi bir hasar vermeden birbirinden ayrılabilir (Macao ve aark. 2006).

2.3.1.2. Jel Formu Musin

Jel formu-musinlerin tümünde her iki yanından N-terminal ve C-terminal'in birbirine bağlanarak oluşturduğu dimerik bir yapıya sahip, merkezi bir musin domeini vardır. Musinlerin bu grubu N-terminal ve C-terminal uçlarını, mukusun tipik jel formunu veren büyük polimerleri oluşturmak için kullanırlar (Gum ve ark. 1994, Thornton ve ark. 2008, Kim ve ark. 2010). Temel intestinal musin MUC2, endojen proteazlara dirençlidir; merkezi musin domeini glikanlar tarafından korunur ve N- ve C-uçları sisteinler arasında meydana gelen sayısız çapraz bağlanmalarla stabilize edilmiştir. Jel formu- musinin esas görevi diğer bazı komponentlerin de eklenmesi ile gastrointestinal sistemi kayganlaştıran ve onu koruyan mukusu oluşturmaktır. Caldara ve ark. (2012), doğal mukusun yapışmaz olduğunu ve hidrofobik olmadığını bu özelliklerin mukus saflaştırılıp toplandıktan sonra ortaya çıktığını savunmaktadırlar.

2.3.2. Kolondaki Mukus ve Özellikleri

Mukus zarının intestinal sistemdeki organizasyonu hakkında en çok bilgi kolon ve MUC2'den elde edilmiştir. Bu musin %20'si protein korundan, kalanı glikanlardan oluşmuş ve kütlesi yaklaşık 2.5MDa olan monomerlerin bir araya gelmesiyle

oluşturmuştur. Monomerler bir araya gelerek yaklaşık 0.6 µm uzunluğuna sahip sıkı çomak şeklinde yapıya sahip merkezi musin domeinini oluşturur. Bu monomerler C- uçlarından dimer, N- uçlarından trimer şeklinde birbirine bağlanarak büyük musin domeinini oluşturur (Godl ve ark. 2002). MUC2 gut lumenine salgılanmadan önce goblet hücrelerinin granüllerinde N- uçları kalsiyum bağımlı etkileşimlerle halka benzeri bir yapı şeklinde bir araya gelir. Bu yapı hücrelerden salınmasını takiben muhtemelen bikarbonatın etkisiyle Ca^{++} iyonları şelatlanır ve sıkı şekilde paketlenmiş musin şemsiyeyi andıracak bir şekilde açılır ve hacmi önceye göre yaklaşık 1000 kat artar. Akabinde dışarıya salınan her bir musin bu şekilde açılarak iç mukus zarını oluşturmak için birbirlerinin üzerine tabaka tabaka yığılırlar (Round ve ark. 2012). Bu zar epitelyum hücrelerine bağlı bir zar yapısı şeklinde iç mukus zarını oluşturur ve aspirasyonla uzaklaştırılmaz. İç mukus zarı sıkı bir şekilde yüzeyi kaplar ve bakterilerin yüzeye tutunmasına imkan vermez. Kolonda iç mukus zarı sürekli olarak goblet hücreleri tarafından yaklaşık bir saat arayla salgılanır. Bu zarın kalınlığı insanda birkaç yüz mikrometre iken farelerdeki kalınlığı daha azdır (Johansson 2012).

İç mukus zarı luminal sınırında dış mukus zarına dönüşür. Yani dış mukus zarı iç mukus zarından oluşur ve aynı komponenti içerir fakat ilginç bir şekilde özellikleri belirgin bir biçimde iç mukus zarından farklıdır; gevşek bir forma sahiptir ve hücrelere bağlı değildir. Ayrıca bakterilerin tutunmasına imkân tanıyan bir yüzey alanına sahiptir. Sıkı formdan gevşek forma geçiş muhtemelen MUC2 musin içindeki proteolitik kesilmelerden kaynaklanır. Bu kesilmeler musinin hacimce 3-4 kat daha fazla büyümesini sağlar üstelik domeinler arasındaki sistein disülfid bağlarından ötürü bu kesilmelere rağmen musindeki polimerik yapı bozulmaz. Bu dönüşümün mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bu dönüşümün bakteriler tarafından değil konukçu tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir; keza dış mukus zarı germ-free farelerde de bulunur (Hansson ve Johansson 2010).

2.3.2.1. Kolondaki Komensal Bakteriler

Kalın bağırsak yani kolon 10^{13} – 10^{14} arasında değişen miktarda komensal bakteriye ev sahipliği yapar. Kolonda ince bağırsaktaki gibi MMC (Migrating Motor Complex) hareketleri meydana gelmez; bunun yerine enterik sinir sistemi, rektuma doğru gelişen ve nihayetinde defekasyon refleksini tetikleyen güçlü peristaltik dalgalar

oluşturur. Bu dalgalar güçlüdür ve sindirilmemiş besin artıklarıyla birlikte mukusun da taşınmasına neden olur. Dolayısıyla fiziksel olarak bakterileri epitelyum hücrelerden ayıran iç mukus zarı (farelerde 50 µm, insanlarda ise birkaç yüz mikrometre) kolondaki homeostasi için önemlidir (Hansson ve Johansson 2010).

Kolondaki dış mukus zarı komensal bakteriler için bir habitatır ve bünyesinde bakteriler için enerji kaynağı olan kısmi olarak sindirilmiş besin artıklarını barındırır. MUC2'nin yanı sıra kısmi olarak sindirilmiş besinler kompleks polisakkaridleri bünyesinde barındırır. Kolonda bulunan bakteriyel faaliyetler sonucu bu kompleks karbohidratlar konukçu epiteli için birer enerji kaynağı olabilen asetat, propionat ve bütirata dönüştürülür (Wong ve ark. 2006).

Her bir türün bakteriyel kompozisyonu birbirinden farklıdır. Ancak bu kompozisyon rastgele değildir. Bu seçimin neye göre yapıldığı bilinmemekte ancak insandaki sabit MUC2 glikan repertuarı, bunun glikan epitoplari tarafından belirlenebileceğini desteklemektedir (Larsson ve ark. 2009).

2.3.2.2. Kolondaki Patojen Mikroorganizmalar

Kolondaki iç mukus zarı bakterilere karşı geçirimsizdir ve patojenik mikroorganizmalar karşı bir engel oluşturur. Patojen mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturabilmesi için özelleşmiş virülens mekanizmalara sahip olması gerekmektedir. Rodent patojen *Citrobacter rodentium*, mukus zarını geçip orda kalabilen patojenlere bir örnektir (Bergstrom ve ark. 2010). Benzer şekilde *Helicobacter pylori* de midede alttaki iç gastrik mukus zarına ulaşabilmesini sağlayan mekanizmalara sahiptir (Moore ve ark. 2011).

İnce bağırsaktaki helmintlerin enfeksiyonu dünya genelinde yaygın bir problemdir ve toplam popülasyonun en az dörtte biri intestinal bir solucanla enfekte olur. *Trichella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis* ve *Hymenolepis diminuta* ile yapılan hayvan deneyleri enfeksiyonun giderilmesinin goblet hücre sayısı ve mukus sekresyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir

Nihayetinde Mukus ve gastrointestinal sistemin epitelyum hücreleri birincil koruyuculardır ve bağışıklık sistemi ile bakteriler arasındaki etkileşimleri bir bakıma

kontrol altında tutarlar (Koninkx ve ark. 1988, McKay ve ark. 1990, Ishikawa ve ark. 1993, Else ve ark. 1997, Ishikawa ve ark. 1997).

2.3.3. Midedeki Mukus ve Özellikleri

Kolon gibi mide de çift tabakalı mukus zarına sahiptir (Atuma ve ark. 2001). İç mukus zarı, MUC5AC ile oluşturulan iç mukus zarı hidroklorik asit için bir difüzyon bariyeri olarak iş görür (Schade ve ark. 1994). Epitel hücre yüzeyleri, asidik lümene karşı bir pH gradiyenti oluşturarak hücre yüzeyini nötralize eden bikarbonat salgırlar (Phillipson ve ark. 2002, Allen ve Flemstrom 2005). Bezlerden üretilen hidroklorik asit MUC6 ve pepsin ile birlikte salgılanır. İlginç bir şekilde bu bezlerin salgıları iç mukus zarından geçici kanallar vasıtasıyla geçerler (Bhaskar ve ark. 1992, Johansson ve ark. 2000). Hemen akabinde kanallar kapanır ama bu mukus yüzeyinde bir iz bırakır. Bezlerin çok yüksek proton konsantrasyonuna (pH 1-2) nasıl dayanabildiği anlaşılmamıştır ancak MUC6 musinin bunda rol oynadığı muhtemeldir. MUC6 musinin gastrik iç mukus zarına katkıda bulunup bulunmadığı tartışma konusudur (Ho ve ark. 2004, Phillipson ve ark. 2008)

2.3.4. İnce Bağırsaktaki Mukus ve Özellikleri

İnce bağırsakta gevşek, hücrelere bağlı olmayan bir mukus zarı mevcuttur. Kolondaki gibi bu zar MUC2 musin tarafından oluşturulmuştur ama ince bağırsaktaki mukus zarı kolondaki iç zardan ziyade dış mukus zarına benzer özellikler sergiler. MUC2 musin prosesinin farklı olması muhtemel görünmesine rağmen, aynı musinin intestinal sistemin farklı segmentlerinde neden bu kadar farklı davranabildiği henüz anlaşılamamıştır.

Mukus zarının ince bağırsak ve kolondaki farklı organizasyonu, bu iki farklı sindirim segmentinin çevresel ve fonksiyonel olarak farklı davranmasından ileri geliyor olabilir. İnce bağırsakta bir yandan besinler absorblanırken bir yandan distal ileum hariç kalan bölgeler steril tutulur. Aksine kolon, metabolizma için önemli bir role sahip kompleks bir flora ile kolonize olmuştur. İnce bağırsakta normalde bakteri maruziyeti, yoğun bir motor aktivitesi ile koordineli yıkama işlemi ile sınırlandırılır (mukus salgısı, CFTR kanallarından salınan klorid başta olmak üzere sıvı sekresyonlar). Bu motor aktivitesi Migrating Motor Complex (MMC) olarak adlandırılan ve enterik sinir sistemi

tarafından oluşturulan bir sistemle gerçekleştirilir. MMC maksimal motor aktivitesini uzun aralıklarla gerçekleştirir ve sekresyonlar ince bağırsaktan yavaşça akar. Bu aktivite muhtemelen gevşek mukusu ve ona bağlı bakterileri distal kolona doğru taşır (Baxter ve ark. 1989, Deloose ve ark. 2012).

İnce bağırsak mukozası, virülens bakteriler ve epitelyum arasındaki teması daha fazla azaltmak için yüksek konsantrasyonlarda antibakteriyel peptidler ve paneth hücreleri ve enterositlerden salgılanmış proteinleri bünyesinde barındırır (Ouellette 2010). Bu antibakteriyel peptidler bakterileri öldürerek veya onları hapsederek epitelyumun bakterilerle en az seviyede temas kurmasını sağlar (Vaishnava ve ark. 2011, Chu ve ark. 2012). Bu koruma işinde mukus zarı difüzyonu sınırlamanın yanında barındırdığı antibakteriyel peptidlerle önemli bir koruma görevi görür (Johansson ve Hansson 2010). Kökteki hücrelerin oluşturduğu ince bağırsak kriptleri özellikle önemlidir. Kolonda olduğu gibi ince bağırsakta da bu bölgelerde herhangi bir fiziksel bariyer bulunmaz. Bu kriptlerin altında bulunan panet hücreleri antibakteriyel peptidler ve lizozimleri salgılamakla kalmaz aynı zamanda yapısal proteinler MUC2 ve DMBT1'i de salgılar. Diğer taraftan bu bölgeler de zaten buralardan salgılanan lizozim ve antibakteriyel peptidler sayesinde steril tutulur (Rosenstiel ve ark. 2007).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

3.1.1.1. Fosfat Tamponunun (PBS) Hazırlanması

1 L hacmindeki PBS tamponu için;

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ ve 2.4 g KH₂PO₄ tuzları tartılarak distile suyla 1 L'ye tamamlandı. Tuzların çözünmesi sağlandıktan sonra çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı. Son olarak çözelti 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildi. Tampon +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.1.2. % 1'lik Triton X-100 Çözeltisinin Hazırlanması

100 mL hacmindeki, % 1'lik Triton X-100 çözeltisi için;

1 mL Triton X-100 alınarak distile suyla 100 mL'ye tamamlandı. Karışması sağlanan çözelti 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildi. Çözelti +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.1.3. Sıvı Luria-Bertani (LB) Besiyerinin Hazırlanması

100 mL hacmindeki sıvı LB besiyeri için;

2.5 g LB tartılarak distile suyla 100 mL'ye tamamlandı. Karışması sağlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.1.4. Katı LB-Agar Besiyerinin Hazırlanması

1 L Hacmindeki katı LB-agar besiyeri için;

25 g LB ve 20 g Bakteriyolojik agar tartılarak distile suyla 1L'ye tamamlandı. Karışması sağlanan besiyeri 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildikten sonra 65-70°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Hemen akabinde steril kabin içinde besiyeri katılaşmadan hızlı bir şekilde 120 mm genişliğindeki steril kare petrilere,

her birine 50 mL gelecek şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı. Katılaşılan besiyerleri +4 °C’de muhafaza edildi.

3.1.1.5. Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması

Hücre kültürünün devamlılığı için hücre pasajlarında kullanılmak üzere 200 mL hacmindeki hücre kültür ortamı;

172 mL Minimum Essential Medium (MEM), 20 mL Fetal Bovine Serum (FBS) (%10), 2 mL L-glutamin, 2 mL Vitamin karışımı, 2 mL non-essential amino asit solüsyonu ve 2 mL antibiyotik karışımı (penicilin / streptomycin / amphotericidin) içerecek şekilde hazırlandı. Hücre kültür ortamı +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.1.6. Antibiyotiksiz (MEM + %10 FBS) Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması

Deneylerde kullanılmak üzere 200 mL hacmindeki MEM + %10 FBS hücre kültür ortamı;

180 mL MEM ve 20 mL FBS (%10) içerecek şekilde hazırlandı. Hücre kültür ortamı +4°C’de muhafaza edildi

3.1.2. Kullanılan Biyokimyasallar ve İnorganik Bileşikler

Minimum Essential Medium (without L-glutamyne) hücre kültür ortamı [Sigma], Fetal Bovine Serum (FBS) [Gibco], NaCl, KCl, Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ tuzları [Merck], Steril fizyolojik su [Eczacıbaşı], L-glutamin [Gibco], Vitamin solüsyonu [Gibco], Amino asit solüsyonu (non-essential) [Gibco], Antibiyotik/Antimikotik solüsyonu (penicilin/streptomycin/amphotericidin) [Sigma], Triton X-100 [Sigma], Trypsin-EDTA (0.25% (w/v) trypsin/0.2% EDTA) [Sigma], Gentamisin 10mg/ml [Sigma], Luria–Bertani (LB) besiyeri [Oxoid], Bakteriyolojik Agar [Oxoid],

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Materyaller

CO₂’li inkübatör [Sanyo], Işık mikroskobu [Zeiss], Spektrofotometre [BIO-RAD], Hücre kültür flaskları (75 cm²) [Granier], 24-wellDoku kültür plakları [Sigma], Pastör pipetleri [Isolab], Hemasitometre [KOVA], Santrifüj [Eppendorf 5417R], Vortex [Genie], Disruptör [Genie], Elektronik pipet pompası [Isolab]. Hassas terazi [Gec-

Avery], Inkübatör [Nüve], 0.45 µm ve 0.20 µm'lik por çapına sahip steril membran filtreler [Milipore].

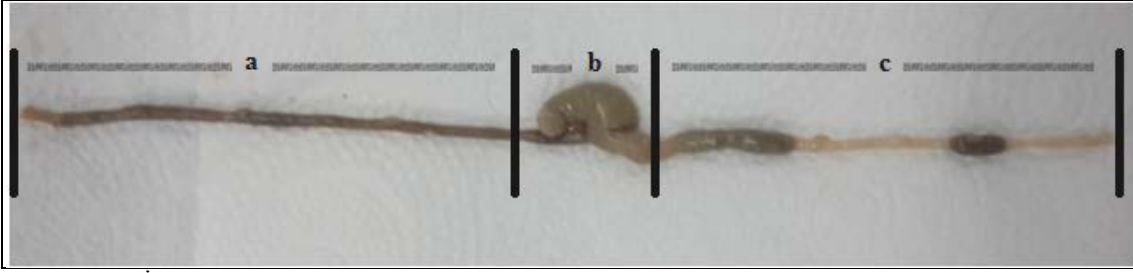
3.1.4. Kullanılan Biyolojik Materyaller

İntestine 407 (ATCC® CCL-6™) hücre hattı ve Adherent-Invasive *E. coli* ırkı LF82, Elisabeth Billard ve Nicolas Barnich'ten temin edildi (M2iSH, UMR 1071 INSERM/Universit'e d'Auvergne, Clermont-Ferrand, Fransa). Ayrıca çalışmada FVB/N ve Balb/c tipi fare ırkları kullanıldı. FVB/N farelerinin kullanımı için d'Auvergne Üniversitesine bağlı ilgili etik kuruldan, Balb/c farelerinin kullanımı için farelerin temin edildiği yer olan İnönü Üniversitesi'nin DHEK biriminden hayvanların çalışmada kullanılabileceğine dair etik kurul raporları alındı.

3.2. Metot

3.2.1. Kolon ve İnce Bağırsağın Farelerden İzolasyonu ve Mukozal İçeriklerin Eldesi

Deneyler için önce 17 adet, 8-10 haftalık, tümü erkek FVB/N, daha sonra 24 adet, 8-10 haftalık, tümü erkek Balb/c tipi fareler kullanıldı. FVB/N fareleri ile ilgili deneyler d'Auvergne Üniversitesi M2iSH araştırma laboratuvarında (Fransa), Balb/c fareleri ile ilgili deneyler de Kafkas Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümüne ait laboratuvarında gerçekleştirildi. Belirtilen prosedürler farklı zamanlarda her iki fare ırkına da benzer şekilde uygulandı. İnce bağırsak ve kolon bölgesindeki mukozal içeriğin eldesi için seçilen farelere öncelikle etik prosedürlere göre servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. Daha sonra karın bölgesi %70'lik etanol uygulamasını takiben dikkatli bir şekilde açıldı. Kolon bir forseps yardımıyla çekuma kadar kaldırıldı. Kolon, rektumdan çekuma kadar olan bir mesafede (yaklaşık 8 cm) izole edildi. Daha sonra ileum da çekumdan yukarıya doğru yaklaşık 10 cm'lik bir mesafede izole edildikten sonra her bir bölge fizyolojik su içeren farklı petri kutularında toplandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3. 1. İzole edilen kolon ve ileumun görünümü. **a,** Çekumdan yukarıya yaklaşık 10 cm'lik bir mesafede izole edilen ileumun görünümü. **b,** Çekum. **c,** Rektumdan çekuma kadar izole edilen kolonun görünümü.

Feçes ve diğer tüm besinsel içerik her iki bölgeden uzaklaştırıldı. Bir makas yardımıyla kolon boyuna kesilerek kolon iç yüzeyi ortaya çıkarıldı. Bir lamel yardımıyla iç yüzey hafifçe kazınarak lümen yüzeyindeki mukozal içerik toplandı. Aynı prosedürler ileum bölgesi için de uygulandı. Her bir bölge için toplanan içerik temiz eppendorf tüplere (her 3 örnek bir tüpe olacak şekilde) aktarıldı ve tüpler etiketlendi.

3.2.2. BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) Ortamlarının Hazırlanması

Hem bakteri ırkının ileum ve kolon bölgelerinden alınan mukozal içerikte sergileyeceği üreme kabiliyetini tayin etmek hemde hücre enfeksiyon deneyleri için, toplanan içerik iki farklı besiyeriyle karıştırılarak BMSM ortamları hazırlandı. Bakteri kültür ortamı için LB sıvı besiyeri, Hücre enfeksiyon deneyleri için de MEM hücre kültür ortamı kullanıldı. Hücre enfeksiyon deneyleri için her bir tüpe yaklaşık 670 µL MEM eklendi. Örneklerin besiyeriyle karışmasını ve parçalanmasını sağlamak için, maksimum hızda 15 dk boyunca +4°C'de disruptörde güçlü bir şekilde karışması sağlandı. Bu sürenin sonunda örnekler 5 dk boyunca +4°C'de 10000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra her bir bölge için toplanan süpernatant farklı bir falkon tüpe aktarıldı. Bakteri kültür ortamı için de aynı işlem, MEM hücre kültür ortamı yerine LB sıvı besiyeri kullanılarak uygulandı.

BMSM ortamının sterilizasyon protokolünü oturtmak amacıyla öncesinde bir pilot çalışmayla UV yöntemi kullanılarak örnekler sterilize edilebildi. Ancak UV ışınlarının aynı zamanda örneklerde bulunması muhtemel biyo-moleküller üzerindeki zararlı etkilerinden dolayı daha sonra sterilizasyon için daha uygun olan filtrasyon yöntemi kullanıldı. Filtrasyon işlemi steril kabinde gerçekleştirildi. Bunun için her bir örnek önce 0.45 µm sonra 0.20 µm por çapına sahip steril membran filtrelerden

geçirilerek steril edildi. Sterilizasyonun kontrolü amacıyla hem LB ile karıştırılan hem de MEM ile karıştırılan örnekler 25 µL hacminde, Mac-Conkey-Agar ve LB-Agar katı besiyerlerine çizgi ekim tekniği ile yayılıp 37°C’de bir gece etüvde inkübe edildi. Bu süre sonunda katı besiyerlerinde herhangi bir üreme veya kontaminasyon gözlenmedi. Bu adımdan sonra BMSM ortamı, bakteriyel kültür ve hücre enfeksiyon deneyleri için hazır hale geldi.

3.2.3. Farklı Bölgelerdeki BMSM Ortamlarında Gelişen Bakteri Sayısının Spektroskopik Olarak Tayini

Farklı bölgelerdeki mukozal içeriklerde gelişen bakteri sayısının spektroskopik olarak tayini için AIEC’in referans ırkı LF82, sadece LB sıvı besiyerine ve önceden FVB/N farelerinden elde edilip LB sıvı besiyeri ile hazırlanarak steril edilen kolon (CR) ve ileuma (IR) ait BMSM ortamlarına ekildi. Seriler için hemoliz tüpleri kullanıldı;

- 500 µL LB (negatif kontrol)
- 500 µL LB + 3 µL LF82
- 500 µL CR (negatif kontrol)
- 500 µL CR + 3 µL LF82
- 500 µL IR (negatif kontrol)
- 500 µL IR + 3 µL LF82

Yukarıda verilen oranlarda hazırlanan seriler bir gece boyunca 37°C’de etüvde inkübe edildi. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Her bir ortamdaki bakteri sayısının spektroskopik olarak tayini için 620 nm ve Abs (O.D.)= 0.1’de 1.6×10^8 /mL bakteriye denk gelen referans değeri kullanıldı. LB ile sıfırlama yaptıktan sonra 620 nm’de CR ve IR negatif kontrollerinin her birinin absorbans (Abs) değerleri, bu örneklerin LF82 ırkı bulunduranlarınkinden çıkarılarak Abs değeri cinsinden net bakteriyel yoğunluk hesaplandı. Daha sonra her bir ortamda gelişen bakteri sayısı oransal olarak 620 nm ve Abs= 0.1’de 1.6×10^8 /mL bakteriye denk gelen referans değeri kullanılarak hesaplandı. Bununla ilgili sonuçlar ARAŞTIRMA BULGULARI kısmında verilmiştir.

3.2.4. Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Bakteriyel Kültür Hazırlanması

Bakteriyel kültür için AIEC'in referans ırkı LF82, sadece sıvı LB besiyerine ekildi. Seriler için hemoliz tüpleri kullanıldı.

- 500 µL LB (negatif kontrol)
- 500 µL LB + 3 µL LF82

Yukarıda verilen oranlarda hazırlanan seriler bir gece boyunca 37°C'de etüvde inkübe edildi.

3.2.5. Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Bakteriyel İnokülümün Hazırlanması

Bakteriyel inokülümün Darfeuille–Michaud ve ark. (2004) göre hazırlandı. Steril şartlar altında örnek LB ile 1:5 oranında (100 µL örnek + 400 µL LB) seyreltildikten sonra iyice pipetaj yapıldı ve spektrometre küvetlerine aktarıldı. Optik dansite (OD) için ölçümler 620 nm'de yapıldı. Gerçek bakteriyel yoğunluğu elde etmek için saf LB kör olarak kullanıldı. Spektroskopik olarak okunan Abs değeri seyreltme faktörü (x5) ile çarpıldıktan sonra, Abs= 0.1 değerine oranlanarak 1.6×10^8 /mL bakteriye denk gelen hacim hesaplandı ve PBS ile 1 mL'ye tamamlandı.

3.2.6. I-407 Hücrelerinin Adezyon ve İnvazyon Deneyleri İçin Hazırlanması:

Çalışma steril kabin içinde yapıldı. İnkübatörde (37°C, %5 CO₂) öngörülen süre boyunca inkübe edilen hücreler alındı. Flask mikroskop altında kontrol edildi. Hücrelerin istenilen yoğunluğa sahip olup olmadığı belirlendikten sonra, eski kültür ortamı uzaklaştırıldı. Flaska 5mL PBS eklenerek yıkandı ve PBS tekrar uzaklaştırıldı. Daha sonra flaska 800 µL tripsin-EDTA eklenerek iyice tabana yayılması sağlandıktan sonra 3-4 dk inkübe (37°C, %5 CO₂) edildi. Süre sonunda flaska 10 mL taze kültür ortamı eklendi ve güçlü pipetaj yardımıyla hücrelerin kabin yüzeyinden uzaklaştırılması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden uzaklaştırıldığından emin olunduktan sonra yaklaşık 10 mL'lik hacmin 3.5 mL'si hücre pasajı için için yeni flaska aktarılıp taze kültür ortamı ile 15 mL ye tamamlanarak hücre kültürünün devamlılığı için 37°C'de %5 CO₂ yoğunluğuna sahip inkübatöre alındı. Kalan hacim yeni bir falkon tüpe aktararak 900 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süre sonunda süpenatant döküldü. Pellet, antibiyotik içermeyen kültür ortamından(MEM + FBS %10) yaklaşık 5 mL eklenerek süspanse

edildi. Daha sonra hücre sayımı için hücre süspansiyonu bir pastör pipeti yardımı ile hemasitometreye aktarıldı. Mikroskop altında hücreler sayıldı. Hemasitometrede sayılan hücreler, her küçük kare başına daha önceden belirlenmiş ortalama hacimden yola çıkarak 4×10^5 hücre/mL hücre yoğunluğunu elde edecek şekilde oranlandı ve hücre süspansiyonundan 4×10^5 hücre/mL hücre yoğunluğunu elde etmek için alınması gereken hacim belirlendi. Daha sonra bu hacim MEM + %10 FBS ile arzu edilen final hacme tamamlandı. İstenilen hücre yoğunluğuna sahip hücre süspansiyonu elde edildikten sonra süspansiyon her kuyucuğa 1ml gelecek şekilde 24- well plate plaklarına aktarıldı. Son olarak hücreler, yaklaşık 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 yoğunluğuna sahip inkübatöre inkübe edildi.

3.2.7. Hücrelerin Enfeksiyonu

Yukarıda belirtilen prosedüre göre hazırlanan hücreler inkübasyon süresinin sonunda PBS ile iki kez yıkandı. Hücrelerin enfeksiyonu için antibiyotiksiz kültür ortamından 1 mL kontrol olarak kullanılmak üzere, önceden CR ve IR bölgelerinden alınarak hazırlanmış her bir steril BMSM ortamı % 20 oranında (200 μL) her bir kuyucuğa eklendi ve antibiyotiksiz kültür ortamı ile 1 mL'ye tamamlandı ve her bir kuyucuğa, LF82 ırkının bakteri süspansiyonundan 25 μL (Abs= 0.1'e göre bakteri süspansiyonu 1.6×10^8 bakteri/mL içerir. Dolayısıyla hacimsel olarak 25 μL bakteri süspansiyonu ortalama 4×10^6 bakteri içerecektir. Her bir kuyucuk ise 4×10^5 hücre/mL içerir) yani ortalama 10 bakteri/hücre olacak şekilde eklenerek hücreler enfekte edildi;

- 1 mL MEM + 10% FBS (negatif kontrol)
- 1 mL MEM + 10% FBS+ 25 μL bakteriyel süspansiyon
- 800 μL MEM + 10% FBS ve 200 μL CR + 25 μL bakteriyel süspansiyon
- 800 μL MEM + 10% FBS ve 200 μL IR + 25 μL bakteriyel süspansiyon

Yukarıda verilen oranlarda hazırlanan seriler 10 dk, 900 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra hücreler 3 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 yoğunluğuna sahip inkübatörde inkübe edildi.

3.2.7.1. Adezyon Deneyi

Adezyon deneyi Darfeuille–Michaud ve ark. (2004) göre yapıldı. İnkübasyon süresinin sonunda adezyon plakası alındı. Kültür ortamı dökülerek her bir kuyucuğa yaklaşık 1 mL PBS gelecek şekilde 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın sonunda plaka bir kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek kalan sıvı da alınarak kurutuldu ve çok beklemeden her kuyucuğa 500 µL olacak şekilde % 1 lik triton X-100 ilave edildi. Güçlü bir pipetaj yapıldıktan sonra her bir kuyucuktaki içeriğin tamamı eppendorf tüplere transfer edildi. Seri seyreltmeler 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} oranlarında (450 µL de 50 µL olacak şekilde) yapıldıktan sonra LB-agar petrilere 25 µL olacak şekilde çizgi ekim tekniği ile ekildi ve koloni sayımı için 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona alındı. Adezyon sonuçları ile ilgili sonuçlar ARAŞTIRMA BULGULARI kısmında verilmiştir.

3.2.7.2. İnvazyon Deneyi

İnvazyon deneyi Darfeuille–Michaud ve ark. (2004) göre yapıldı. İnkübasyon süresi dolmadan önce % 1 oranında gentamisin (10 mg/mL) içeren kültür ortamı, örnek sayısına göre final hacim belirlenip taze olarak hazırlandı. İnkübasyon süresinin sonunda invazyon plakası alındı. Kültür ortamı dökülerek her bir kuyucuğa yaklaşık 1 mL PBS gelecek şekilde 2 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın sonunda plaka bir kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek kuruması sağlandı ve çok beklemeden her kuyucuğa 1 mL olacak şekilde gentamisinli kültür ortamı ilave edildi. Hücreler 1 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂ yoğunluğuna sahip inkübatörde inkübe edildi. Bu süre sonunda tekrar kültür ortamı dökülerek her bir kuyucuğa yaklaşık 1 mL PBS gelecek şekilde 1 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın sonunda plaka bir kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek kuruması sağlandı ve çok beklemeden her kuyucuğa 500 µL olacak şekilde % 1’lik triton X-100 ilave edildi. Güçlü bir pipetaj yapıldıktan sonra her bir kuyucuktaki içeriğin tamamı eppendorf tüplere transfer edildi. Seri seyreltmeler 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , oranlarında (450 µL de 50 µL olacak şekilde) yapıldıktan sonra LB-agar kare petrilere 25 µL olacak şekilde çizgi ekim tekniği ile ekildi ve koloni sayımı için 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona alındı. İnvazyon sonuçları ile ilgili sonuçlar ARAŞTIRMA BULGULARI kısmında verilmiştir.

3.2.8. İstatistik Hesaplamalar

FVB/N farelerine ait adezyon/invazyon deneyleri birbirinden bağımsız iki tekrarlı, diğer tüm deneyler birbirinden bağımsız üçer tekrarlı yapıldı. Ayrıca her bir deney kendi içinde her örnekten üçer set olacak şekilde yapıldı. Sayısal veriler ortalama şeklinde ve standart hataları ile birlikte verildi. Hesaplamalar için Microsoft Excel programı kullanıldı. Bağımsız veriler arasındaki anlamlılık, İki Örnek İçin 2-yönlü Student's t testi ile kontrol edildi. 0.05'ten küçük P değerleri istatistik olarak önemli kabul edildi ($P < 0.05$).

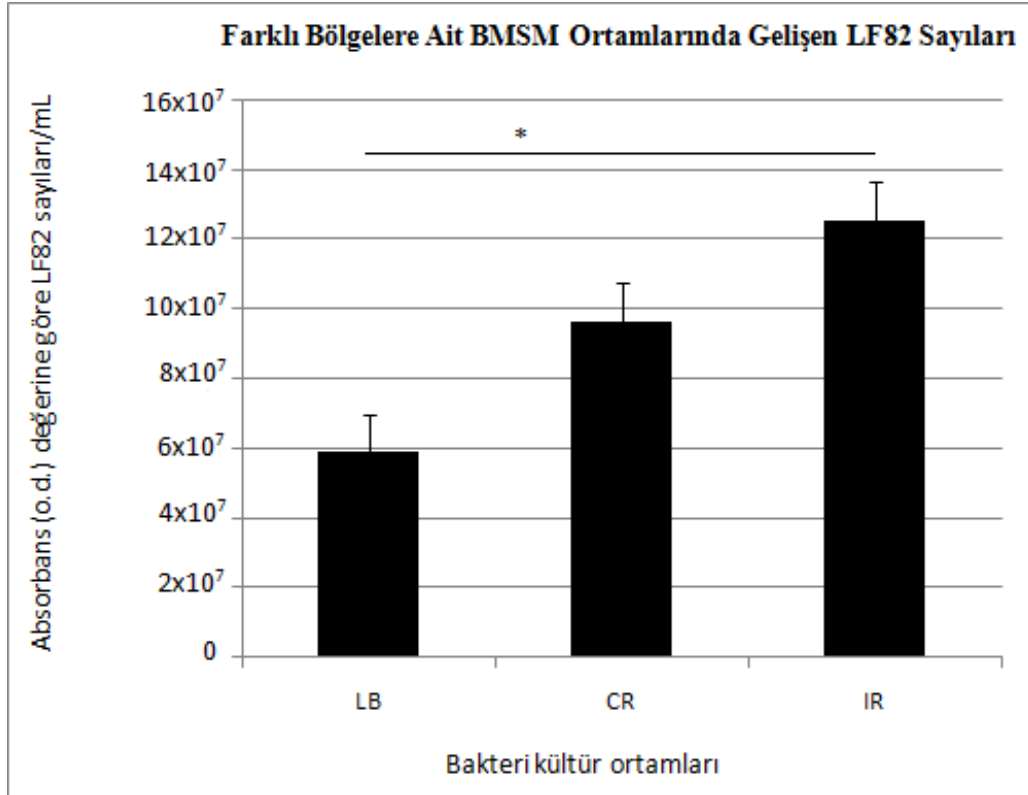
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Farklı Bölgelerdeki BMSM Ortamlarında Gelişen Bakteri Sayısının Spektroskopik Olarak Tayininden Elde Edilen Bulgular

AIEC ırkı, LF82'nin FVB/N farelerine ait ileum ve kolon bölgelerinden elde edilmiş BMSM ortamlarında sergileyeceği üreme kabiliyetini tayin etmek amacıyla gerçekleştirilen deneyde, 37°C'de bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda her bir ortamdaki bakteri sayısının spektroskopik olarak tayini için 620 nm'de ve Abs= 0.1'de 1.6×10^8 /mL bakteriye denk gelen referans değeri kullanıldı. LB ile sıfırlama yaptıktan sonra 620 nm'de CR ve IR negatif kontrollerinin her birinin Abs değerleri, bu örneklerin LF82 ırkı bulunduranlarındakinden çıkarılarak Abs değeri cinsinden net bakteriyel yoğunluk hesaplandı. Daha sonra her bir ortamda gelişen bakteri sayısı oransal olarak Abs= 0.1'de 1.6×10^8 /mL bakteriye denk gelen referans değeri kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 4.1. Kolon ve ileumdan elde edilmiş BMSM ortamlarında gelişen LF82 ırkının Abs = 0.1'e göre hesaplanmış sayıları (Abs = 0.1 değeri 1.6×10^8 LF82/mL'ye denk gelir). Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

Ortamlar	Absorbans değerine göre bakteri sayısı LF82/mL
Luria-Bertani (LB)	$5.93 \times 10^7 \pm 1.07 \times 10^7$
Kolona ait BMSM ortamı (CR)	$9.63 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^7$
İleuma ait BMSM ortamı (IR)	$12.5 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^7$

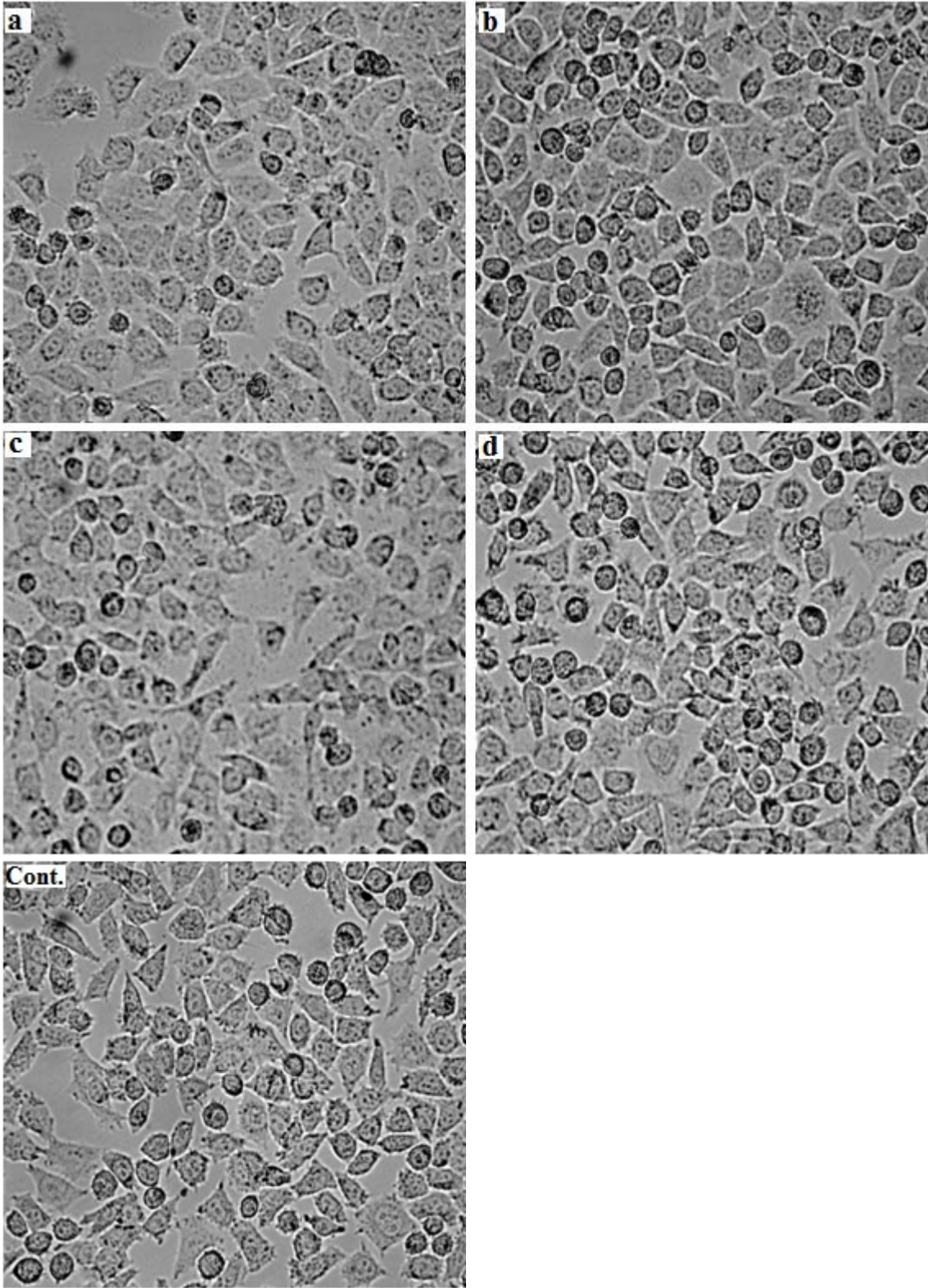


Şekil 4. 1. Kolon ve ileumdan elde edilmiş BMSM ortamlarında gelişen LF82 ırkının Abs=0.1'e göre hesaplanmış sayılarını gösteren grafik (Abs.=0.1 değeri 1.6x10⁸LF82/mL denk gelir). Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir.* P<0.05'i ifade eder

Belirtilen hesaplamalar neticesinde LF82 ırkının, LB ortamına göre CR bölgesine ait BMSM ortamında önemli olmasa da (P= 0.076) daha fazla sayıda ürediği, IR bölgesine ait BMSM ortamında ise LB ortamına göre önemli bir farkla ve ortalama iki katı sayıda ürediği tespit edildi (Çizelge 4.1., Şekil 4.1.).

4.2. BMSM Ortamlarının I-407 Hücreleri Üzerindeki Etkisiyle İlgili Mikroskopik Gözlemler

Hazırlanmış olan BMSM ortamlarının hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla her bir BMSM ortamını içeren (kolon ve ileum) hücreler, kontrol olarak seçilen normal hücre kültür ortamını hücrelerle birlikte deney protokolünde hücre enfeksiyon deneyindeki 3 saatlik inkübasyon süresi kadar inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda yıkamadan önce ve yıkamadan sonra inverted mikroskop altında görüntüleri alındı. Görüntüler incelendiğinde hem CR ortamını içeren hem de IR ortamını içeren hücrelerin yıkamadan önce ve yıkamadan sonra normal hücre kültür ortamı içeren kontrol (Cont.) gurubu hücreleri ile benzer bir görünüme sahip olduğu görüldü (Şekil 4.2.). Dolayısıyla kolon ve ileum bölgelerinden alınan mukozal içeriklerle hazırlanan ve belli oranda (%20) hücre kültür ortamına eklenen BMSM ortamlarının hücreler üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadığı görüldü.



Şekil 4. 2. Kolona ve ileuma ait BSM ortamlarını içeren I-407 hücrelerine ait mikro-fotoğraflar. **a** (kolon) ve **c** (ileum), 3 saatlik hücre inkübasyon periyodundan sonra PBS ile yıkama yapılmadan önce çekilmiş. **b** (kolon) ve **d** (ileum), 3 saatlik hücre inkübasyon periyodundan sonra PBS ile yıkama yapıldıktan sonra çekilmiş. **Cont.**, normal hücre kültür ortamı içeren hücreler. (İyi bir görsel karşılaştırma için hücre yoğunluğu benzer alanlar seçilmeye çalışılmıştır. Büyütme: x400)

4.3. FVB/N Farelerine Ait Adezyon ve İnvazyon Sonuçları

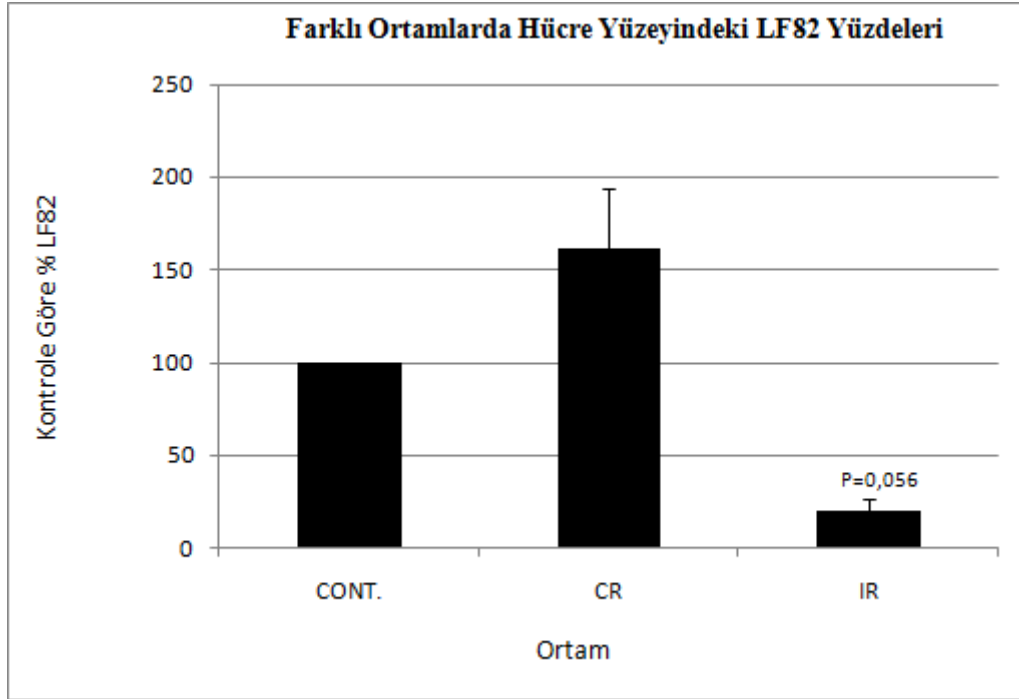
4.3.1. Adezyon Sonuçları

Örnekler Adezyon deneyine tabi tutulduktan (3.2.7.1. Adezyon Deneyi) sonra farklı oranlarda seyreltilmiş örnekler katı LB-agar besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildi. Adezyon sonuçları 37°C’de bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda koloni sayıları (CFU) dikkate alınarak hesaplandı. Sayısı 30’un altında (<30) ve 300’ün üstünde (>300) olan koloniler ihmal edildi.

Çizelge 4.2. FVB/N farelerine ait adezyon sonuçları. Kontrole göre % Adezyon değeri kontrol ortamında hücre yüzeyindeki ve hücre içindeki toplam LF82 sayısı % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Kontrole göre % adezyon oranları standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

Ortamlar	Kontrole göre % Adezyon
Kontrol (CONT.)	100 $\pm$ 0
Kolona ait mukozal içerik (CR)	161 $\pm$ 32
İleuma ait mukozal içerik (IR)	19 $\pm$ 7

FVB/N farelerine ait adezyon sonuçları incelendiğinde kolona ait BMSM ortamı içeren ortamda bakterinin önemli bir farkla olmasa yüzde adezyon değeri olarak kontrole göre daha fazla oranda hücrelere yapıştığı görüldü. Diğer taraftan bakterinin ileuma ait BMSM ortamı içeren ortamda kolonun aksine yüzde adezyon değeri olarak kontrole göre daha düşük bir oranda hücrelere yapıştığı görüldü (Çizelge 4.2., Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. FVB/N farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

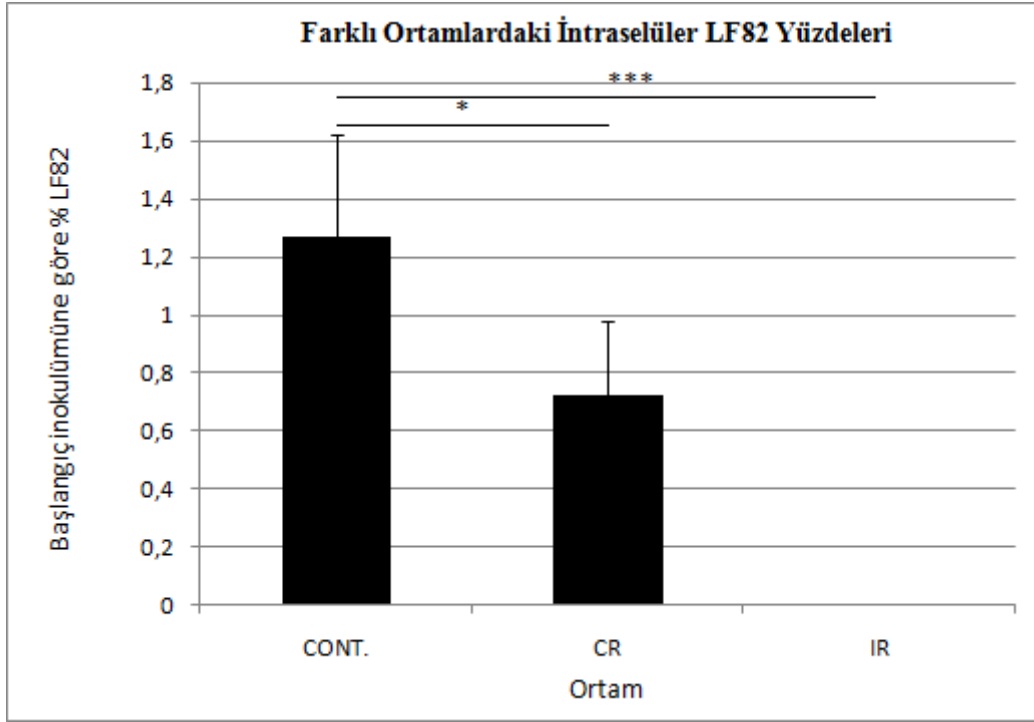
4.3.2. İnvazyon Sonuçları

Örnekler İnvazyon deneyine tabi tutulduktan (3.2.7.2. İnvazyon Deneyi) sonra farklı oranlarda seyreltilmiş örnekler katı LB-agar besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildi. İnvazyon sonuçları 37°C’de bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda CFU sayıları dikkate alınarak hesaplandı. Sayısı 30’un altında (<30) ve 300’ün üstünde (>300) olan koloniler ihmal edildi.

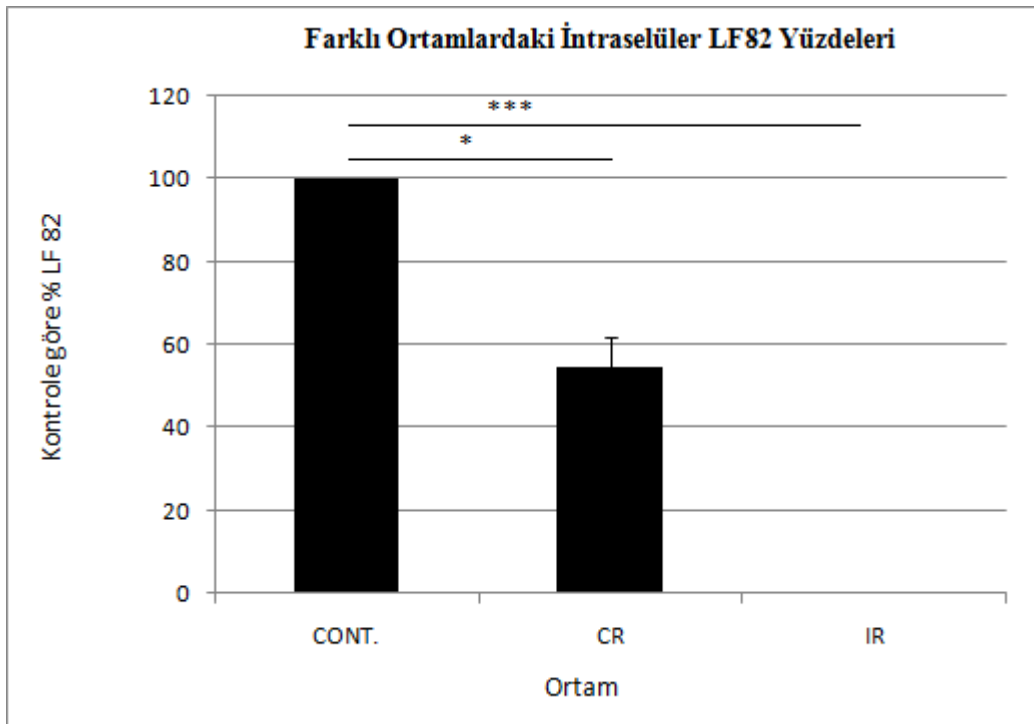
Çizelge 4.3. FVB/N farelerine ait invazyon sonuçları. Başlangıç inokülümüne göre % İnvazyon oranı, başlangıç inokülümü olan 4×10^6 LF82/mL değeri % 100 kabul edilerek; kontrole göre % İnvazyon oranı ise kontrol ortamında bulunan intraselüler LF82 sayısı % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Hem başlangıç inokülümüne göre hem de kontrole göre % İnvazyon oranları standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

Ortamlar	Başlangıç inokülümüne göre % İnvazyon	Ortamlar	Kontrole göre % İnvazyon
Kontrol (CONT.)	1.2 $\pm$ 0.4	Kontrol (CONT.)	100 $\pm$ 0
Kolona ait mukozal içerik (CR)	0.7 $\pm$ 0.2	Kolona ait mukozal içerik (CR)	55 $\pm$ 7
İleuma ait mukozal içerik (IR)	0 $\pm$ 0	İleuma ait mukozal içerik (IR)	0 $\pm$ 0

FVB/N farelerine ait invazyon sonuçları incelendiğinde ise hem başlangıç inokülümü hem de kontrol ortamındaki intraselüler LF82 sayısı % 100 kabul edildiğinde kolona ait BMSM ortamını içeren ortamda intraselüler LF82 oranlarının kontrole göre önemli bir farkla, oldukça düşük olduğu görüldü. Diğer taraftan ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda intraselüler LF82 ile ilgili ihmal edilecek seviyede ($<<30$) koloni sayıldığı için bu başlangıç inokülümüne göre ve kontrole göre yüzde invazyon değerlerine sıfır olarak yansıdı. İleuma ait BMSM ortamını içeren ortamdaki intraselüler LF82 oranının hem başlangıç inokülümüne göre hem de kontrole göre %0 olduğu görüldü (Çizelge 4.3., Şekil 4.4 ve 4.5.).



Şekil 4. 4. FVB/N farelerine ait başlangıç inokulumüne göre % invazyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir. * $P<0.05$ 'i, *** $P<0.001$ 'i ifade eder



Şekil 4. 5. FVB/N farelerine ait kontrole göre % invazyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir. * $P<0.05$ 'i, *** $P<0.001$ 'i ifade eder

4.4. Balb/c Farelerine Ait Adezyon ve İnvazyon Sonuçları

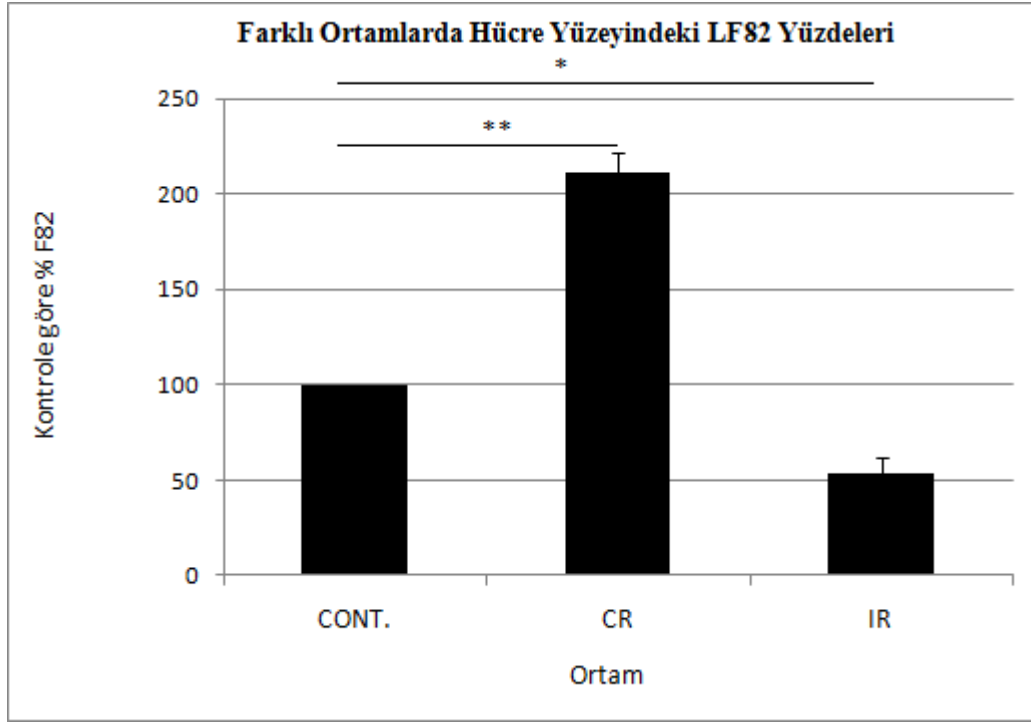
4.4.1. Adezyon Sonuçları

Örnekler Adezyon deneyine tabi tutulduktan (3.2.7.1. Adezyon Deneyi) sonra farklı oranlarda seyreltilmiş örnekler katı LB-agar besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildi. Adezyon sonuçları 37°C’de bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda CFU sayıları dikkate alınarak hesaplandı. Sayısı 30’un altında (<30) ve 300’ün üstünde (>300) olan koloniler ihmal edildi.

Çizelge 4.4. Balb/c farelerine ait adezyon sonuçları. Kontrole göre % Adezyon değeri kontrol ortamında hücre yüzeyindeki ve hücre içindeki toplam LF82 sayısı % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Kontrole göre % adezyon oranları standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

Ortamlar	Kontrole göre % Adezyon
Kontrol (CONT.)	100 $\pm$ 0
Kolona ait mukozal içerik (CR)	211 $\pm$ 10
İleuma ait mukozal içerik (IR)	54 $\pm$ 8

Balb/c farelerine ait adezyon sonuçları incelendiğinde kolona ait BMSM ortamı içeren ortamda bakterinin yüzde adezyon değeri olarak ve güçlü bir önemlilik farkıyla kontrole göre daha fazla bir oranda hücrelere yapıştığı görüldü. Keza kolona ait BMSM ortamı içeren ortamda bakterinin yüzde adezyon değeri olarak kontrole göre neredeyse iki katı oranda hücrelere yapıştığı görüldü. Diğer taraftan bakterinin ileuma ait BMSM ortamı içeren ortamda kolonun aksine yüzde adezyon değeri olarak kontrole göre daha düşük bir oranda hücrelere yapıştığı görüldü. İleuma ait BMSM ortamı içeren ortamda da kontrole göre yaklaşık yarı oranda bakterinin hücrelere yapıştığı görüldü (Çizelge 4.4., Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Balb/c farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir. * $P<0.05$ 'i, ** $P<0.01$ 'i ifade eder

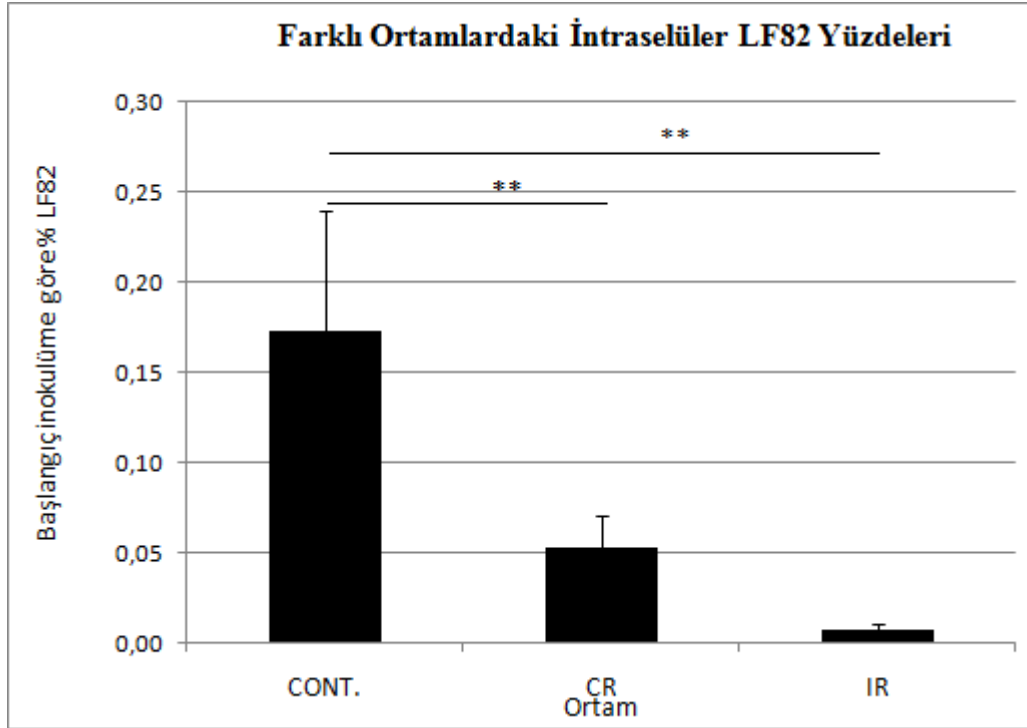
4.4.2. İnvazyon Sonuçları

Örnekler İnvazyon deneyine tabi tutulduktan (3.2.7.2. İnvazyon Deneyi) sonra farklı oranlarda seyreltilmiş örnekler katı LB-agar besiyerine çizgi ekim tekniği ile ekildi. İnvazyon sonuçları 37°C'de bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda CFU sayıları dikkate alınarak hesaplandı. Sayısı 30'un altında (<30) ve 300'ün üstünde (>300) olan koloniler ihmal edildi.

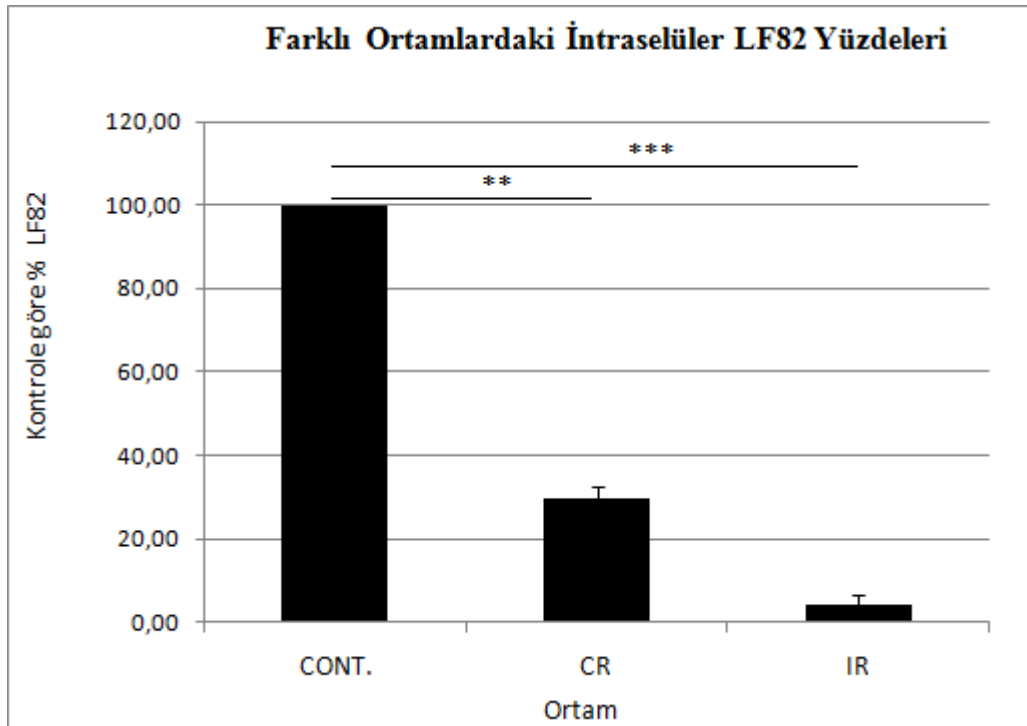
Çizelge 4. 5. Balb/c farelerine ait invazyon sonuçları. Başlangıç inokülümüne göre % İnvazyon oranı, başlangıç inokülümü olan 4×10^6 LF82/mL değeri % 100 kabul edilerek; kontrole göre % İnvazyon oranı ise kontrol ortamında bulunan intraselüler LF82 sayısı % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Hem başlangıç inokülümüne göre hem de kontrole göre % İnvazyon oranları standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir

Ortamlar	Başlangıç inokülümüne göre % İnvazyon	Ortamlar	Kontrole göre % İnvazyon
Kontrol (CONT.)	0.17 ± 0.07	Kontrol (CONT.)	100 ± 0
Kolona ait mukozal içerik (CR)	0.05 ± 0.02	Kolona ait mukozal içerik (CR)	30 ± 3
İleuma ait mukozal içerik (IR)	0.01 ± 0.005	İleuma ait mukozal içerik (IR)	4.3 ± 2

Balb/c farelerine ait invazyon sonuçlarına bakıldığında ise hem başlangıç inokülümü hem de kontrol ortamındaki intraselüler LF82 sayısı 100 kabul edildiğinde, kolona ait BMSM ortamını içeren ortamda intraselüler LF82 oranlarının kontrole göre önemli bir farkla, oldukça düşük olduğu görüldü. Diğer taraftan ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda kontrole göre intraselüler LF82 ırkının önemli bir farkla çok düşük oranlarda olduğu görüldü. Keza ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda kontrolle karşılaştırınca hem başlangıç inokülümüne göre hem de intraselüler LF82 sayısı 100 kabul edildiğinde kolondan oldukça düşük oranlarda olduğu görüldü (Çizelge 4.5., Şekil 4.7 ve 4.8.)



Şekil 4. 7. Balb/c farelerine ait başlangıç inokülümüne göre % invazyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir. * P<0.05'i, *** P<0.001'i ifade eder



Şekil 4. 8. Balb/c farelerine kontrole göre % invazyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama $\pm$ SH) şeklinde verilmiştir. * P<0.05'i, *** P<0.001'i ifade eder

4.5. FVB/N ve Balb/c Farelerine Ait Kontrole Göre Yüzde (%)

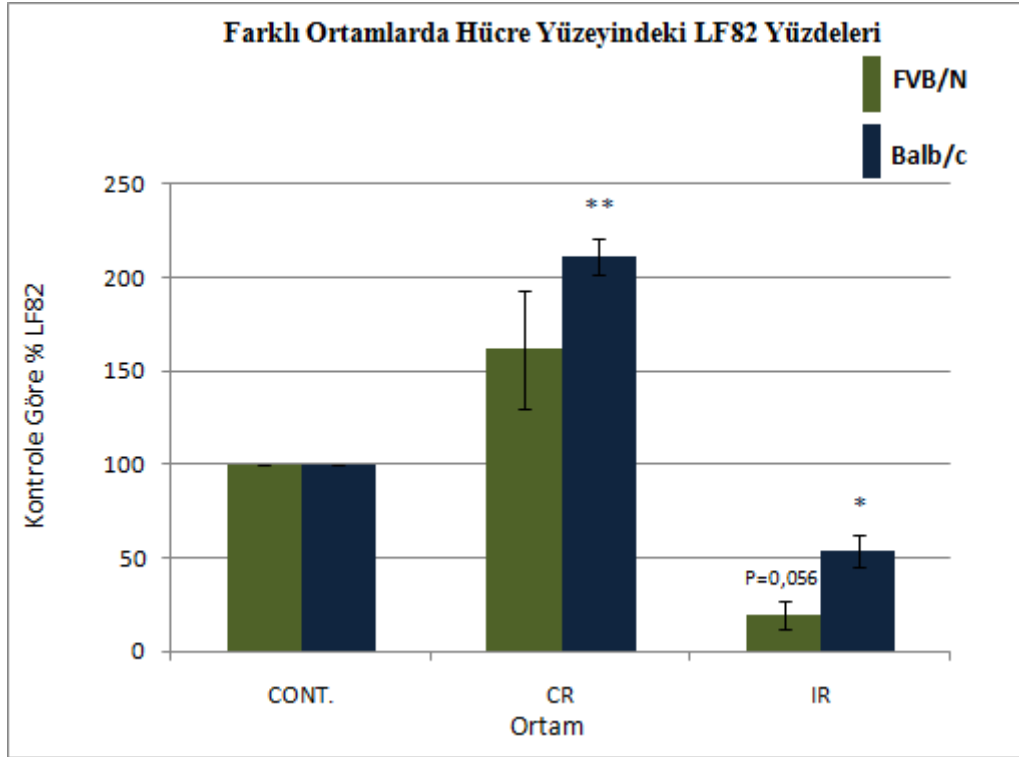
Adezyon ve İnvazyon Değerlerinin Birlikte Gösterimi

Her iki fare ırkındaki adezyon değerlerine bakıldığında yüzde adezyon değeri olarak kolona ait BMSM ortamını içeren ortamda LF82'nin hücrelere kontrole göre daha fazla oranda yapıştığı görüldü. Diğer taraftan ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda ise LF82'nin kontrole göre oldukça düşük oranda hücrelere yapıştığı görüldü. Keza ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda kontrolle karşılaştırınca % adezyon değeri olarak kolondan oldukça düşük olduğu görüldü (Çizelge 4.2., Şekil 4.3 ; Çizelge 4.4, Şekil 4.6).

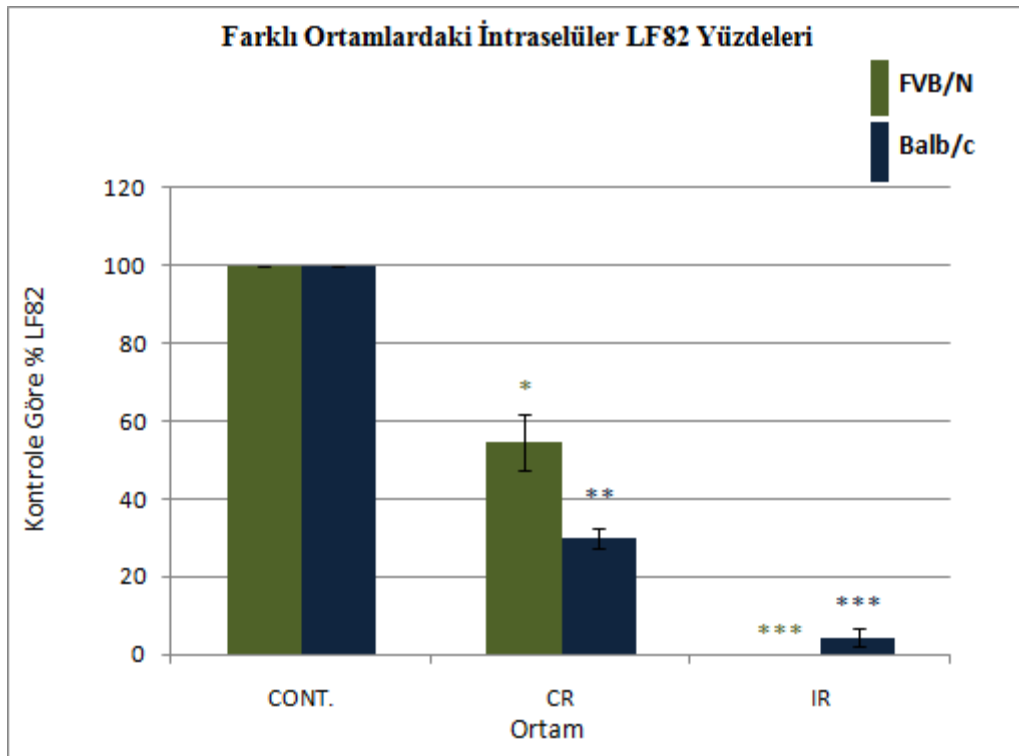
Adezyon değerlerinden her iki fare ırkına da ait sonuçları yansıtan % adezyon değerleri, birlikte verildi (Şekil 4.9.).

Her iki fare ırkındaki invazyon değerlerine bakıldığında ise hem başlangıç inokulümüne göre hem de kontrol ortamındaki intraselüler LF82 sayısı % 100 kabul edildiğinde, kolona ait BMSM ortamını içeren ortamda intraselüler LF82 oranlarının kontrole göre daha az olduğu görüldü. İleuma ait BMSM ortamını içeren ortamda ise intraselüler LF82'nin kontrole göre çok daha düşük oranlarda olduğu görüldü. Keza ileuma ait BMSM ortamını içeren ortamda kontrolle karşılaştırınca hem başlangıç inokulümüne göre hem de kontrol ortamındaki intraselüler LF82 sayısı % 100 kabul edildiğinde kolondan oldukça düşük oranlarda olduğu görüldü (Çizelge 4.3., Şekil 4.4 ve 4.5.; Çizelge 4.5., Şekil 4.7 ve 4.8.)

İnvazyon değerlerinden her iki fare ırkına da ait sonuçları daha önemli farklarla yansıtan kontrol ortamındaki intraselüler LF82 sayısının % 100 kabul edildiği değerler, birlikte verildi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. FVB/N ve Balb/c farelerine ait kontrole göre % adezyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir.** $P<0.01$ 'i, * $P<0.05$ 'i ifade eder.



Şekil 4.10. FVB/N ve Balb/c farelerine ait kontrole göre % invazyon grafiği. Değerler standart hatalarıyla birlikte ortalama (Ortalama±SH) şeklinde verilmiştir.*** $P<0.001$ 'i ** $P<0.01$ 'i, * $P<0.05$ 'i ifade eder.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan onca araştırmaya rağmen Crohn hastalarının inflamasyonlu ileal dokularında yüksek bir yoğunlukta bulunabilen AIEC ırklarının bu hastalığın etiopatojenezinde ne derece rol oynadığı henüz netleşmemiştir. Bakterinin inflamasyonlu ileal dokularda kontrole nazaran daha yüksek bir yoğunlukta bulunduğu yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur. Ayrıca AIEC'in inflamasyonlu bölgelerde baskın bir tür haline gelebildiği ve inflamasyonu daha da kötü bir hale getirebildiği de belirlenmiştir (Carvalho ve ark. 2008). Ancak bu ırkların tek başına inflamasyona neden olabildiği ile ilgili bulgular tatmin edici değildir.

Hayvan modelleri ile yapılan birkaç çalışma AIEC'in enfeksiyona neden olabilmesi için intestinal inflamasyona ve/veya mikrobiyal disbiyosise ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Etkili bir kolonizasyon ancak farelere antibiyotik [Carvalho ve ark. 2009, Drouet ve ark.2012, Small ve ark. 2013), DSS (Carvalho ve ark. 2008) ya da yüksek-yag/yüksek-şeker içeren diyet (Martinez-Medina ve ark. 2014) verildiğinde meydana gelmiştir. Enfeksiyondan önce yapılan bu uygulamalar gastro intestinal sistemdeki (gis) bakteri kompozisyonunda ve mukozal homeostastik bir değişime neden olmuştur. Ayrıca farelerde protozoa enfeksiyonu meydana gelmiş iletisin endojen mukozal invaziv *E. coli* proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir. (Craven ve ark. 2012). Dolayısıyla özellikle Crohn hastalarında intestinal bariyerdeki genetik veya çevresel kökenli defektler AIEC'nin kolonizasyonunda ve gastrointestinal bölgeye geçişinde belirleyici olabilir. Keza Crohn hastlarındaki mevcut bazı bozukluklar AIEC'in enfeksiyona neden olma kabiliyetinde artışa neden olmaktadır. Örneğin AIEC'in adezyon ve invazyonunu kolaylaştıran intestinal epitelyum hücrelerinin apikal membranında bulunan CEACAM6 ve Gp96 reseptörlerinin aşırı ekspresyonu bu bozukluklardan biridir (Barnich ve ark. 2007, Rolhion ve ark. 2010). Ayrıca otofaji ilişkili NOD2, ATG16L1 ve IRGM genlerinin ekspresyonundan kaynaklı bozukluklar da buna dahildir. Keza bu genlerdeki bozukluklar konukçu hücrelerin enfeksiyonları ayırt edememesine neden olur (Lapaquette ve ark. 2010, Lapaquette ve ark. 2012). Ek olarak Crohn hastalarında bozulmuş safra tuzu metabolizması AIEC'te, bakterinin M hücreleri aracılığı ile tranlokasyonunu kolaylaştıran long polar fimria (lpf) ekspresyonunu artırır (Chassaing ve ark. 2013). Dahası iltihabi bağırsak hastalarında

şiddetli inflamasyonun karakteristiklerinden olan proteaz meprin'in azalmış seviyeleri, AIEC'in konukçuya kolonize olma özelliğinde belirleyicidir keza bu proteazlar type-1 pili'yi parçalar (Vazeille ve ark. 2011).

Bu çalışmalar göstermiştir ki inflamasyon ve disbiyosis AIEC proliferasyonunu destekler. Bu yüzden AIEC'nin intestinal sistemdeki aşırılığı ve yüksek yoğunluğu inflamasyonun bir sonucu olarak görülebilir.

Diğer taraftan, son çalışmalar AIEC kaynaklı enfeksiyonun intestinal mikrobiyomda kalıcı değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Çalışma spontan kolit gelişimine yatkın flagellin reseptörü TLR5'e sahip olmayan (T5KO) knockout fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. T5KO farelerin AIEC ile geçici kolonizasyonunun daha büyük proinflamatuvar potansiyeline sahip gis mikrobiyomunun oluşumu ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Chassaing ve ark. 2014). AIEC enfeksiyonunun konukçunun mukozal immun sistemi, bariyer geçirgenliği ve inflamasyonun indikasyonu üzerindeki etkileri çoklu hayvan deneyleri ile bir kaç çalışmada gösterilmiştir (Carvalho ve ark. 2008, Carvalho ve ark. 2009, Denizot ve ark. 2012, Drouet ve ark. 2012, Small ve ark. 2013, Chassaing ve ark. 2014, Martinez-Medina ve ark. 2014). Bu çalışmalar göz önüne alındığında ise AIEC'nin intestinal sistemdeki aşırı ve yüksek yoğunluktaki varlığı inflamasyonun bir nedeni olarak görülebilir. Ancak bu çalışmalarda, daha önce de belirtildiği gibi enfeksiyon öncesi yapılan bir takım uygulamalar (özellikle antibiyotik uygulamasının), AIEC'in tek başına inflamasyona neden olamayacağına dair izler taşımaktadır. Diğer taraftan bu çalışmalar AIEC'nin bir patojenden ziyade patobiyont olduğu kabulünü desteklemektedir. Bir patobiyont normal şartlar altında sağlıklı mukozada yerleşik olarak yaşar ve konukçuya zarar vermez. Ancak çevresel ve genetik şartlar bozulduğunda ya da değiştiğinde konukçada patolojik reaksiyonların gelişmesine yol açar (Janet ve ark. 2011). AIEC ırklarının birçoğunun genomunda tespit edilen virülens genlere ve prototip ırk LF82'nin rapor edilmiş patojenite mekanizmasına rağmen, AIEC genellikle patobiyont olarak kabul edilir. Bu kabul aynı zamanda Crohn hastalarından daha düşük sıklıkta bulunmasına rağmen, sağlıklı örneklerin de intestinal mukozalarında AIEC taşımalarından ileri gelmektedir. (Baumgart ve ark. 2007, Martinez-Medina ve ark. 2009, Sasaki ve ark. 2007, Darfeuille-Michaud ve ark. 2004, Doğan ve ark. 2013).

AIEC ırklarının sağlıklı dokulardan da elde edilmesi araştırmacıları bu ırkın normal intestinal sistemdeki yerleşim yerinin neresi olduğuna dair çalışmalara yöneltmiştir. Mevcut şartlar altında AIEC ırkının mukozadaki lokalizasyonunun tam olarak neresi olduğunu belirlemek mümkün değildir; çünkü AIEC patotip'ine özgü moleküler hedefler henüz mevcut değildir. Bilinen referans ırklarla enfekte edilen bazı hayvan modelleri ile ilgili bazı bulgular elde edilmiştir. Örneğin O83 antijeninin boyanması ile LF82 ve NRG857c ırkları birkaç fare modelinde yapılan deneylerde ileum, kolon ve çekumda lokalize olmuş şekilde kriptlerin kaidesinde ve makrofajların içinde tespit edilmişlerdir (Small ve ark. 2013). GFP (Green Flouresan Protein) içeren plazmitlere sahip LF82 ırkları ile yapılan bir diğer çalışmada güçlü bir gut kolonizasyonu görülmesine rağmen, bakterilerin lümende kaldığı ve intestinal epitelyum hücrelerine yapışmadığı tespit edilmiştir (Simonsen ve ark. 2011). Bakteriyel adezyon ve invazyonu görüntüleyebilmek için *E. coli* liposakkaridlerinin spesifik antikolarla boyandığı bir çalışmada da DSS uygulanmış fareler floresan işaretli LF82 ile enfekte edilmiş ve enfekte fareler, enfekte olmayan farelerle karşılaştırmışlardır. Veriler enfekte farelerin enfekte olmayanlarla karşılaştırıldığında intestinal epitelyum hücrelerinde ve lamina propriada, AIEC'nin intestinal epitelyum hücrelerine invazyonunu ve tranlokasyonunu destekleyen yüksek miktarda AIEC varlığını göstermiştir. Ancak AIEC'in intestinal mukozada belli bir bölgede lokalize olarak bu etkiyi gösterdiğine dair bir bulguya rastlanılmamıştır (Low ve ark. 2013). Bu bağlamda bu ırkların intestinal mukozadaki yerleşim yerinin belirlenmesi bu bakterinin hastalığın gelişiminde tam olarak nasıl bir rol oynadığı ile ilgili önemli veriler sunacaktır.

Yaptığımız çalışmada hem AIEC referans ırkı LF82'yi intestinal sistemin farklı bölgelerinden (kolon ve ileum) elde ettiğimiz mukozal içeriklerle hazırladığımız BMSM ortamlarında kültüre ettik hem de bu BMSM ortamlarını belli bir oranda (% 20) hücre kültür ortamına ekleyerek bu ırkın farklı ortamlardaki adheziv ve invaziv özelliklerini karşılaştırdık. Bu yaklaşımdan hareketle bu ırkın sağlıklı intestinal sistemdeki yerleşim yeri ile ilgili ipuçları elde etmeye çalıştık.

Çalışmayı farklı zamanlarda iki farklı fare ırkı kullanarak gerçekleştirdik. Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulardan ilki, LF82'nin farklı bölgelerden elde edilen mukozal içeriklerle hazırlanan BMSM ortamlarındaki üreme kabiliyeti ile ilgiliydi. Buna göre LF82 ırkı, hem CR hem de IR bölgelerinden elde edilen ortamlarda, LB

ortamına göre daha iyi üreyebildi. Anlamlı bir şekilde LF82'nin en iyi üreyebildiği ortam ileumdan elde edilen ortamdı. Keza LB ortamıyla karşılaştırıldığında bakteri bu ortamda önemli bir farkla ve ortalama iki katı sayıda üredi (Çizelge 4.1., Şekil 4.1.). Sağlıklı doku örneklerinin ex-vivo olarak AIEC ile enfekte edildiği bir çalışmada AIEC LF82 bakterisinin ileal dokulara kolon dokularıyla karşılaştırıldığında daha yüksek bir sayıda yapıştığı tespit edilmiştir (Jensen ve ark. 2011). Ayrıca başka bir çalışmada *E. coli* popülasyonu içindeki AIEC oranı kolonda % 0.95, ileumda ise % 3.58 olarak tespit edilmiştir (Martinez-Medina ve ark. 2009). Ek olarak diğer çalışmalardan elde edilen veriler sağlıklı örneklerde kolonda % 0'dan % 15.8'e kadar; ileumda ise % 6.2'den % 18'e kadar değişen oranlarda AIEC varlığını göstermiştir (Seksik ve ark. 2003, Baumgart ve ark. 2007, Vasques ve ark. 2007). AIEC iltihabi bağırsak hastalığı taşımayan bireylerde de kolonize olabilmesine rağmen, bu bakteriler genellikle mukozal bariyerden içeri geçmezler çünkü sağlıklı örneklerde bakteriyel invazyon gözlenmemiştir (Seksik ve ark. 2003, Baumgart ve ark. 2007, Vasques ve ark. 2007). Bu verilerin tümü birlikte "asemptomatik" taşıyıcı olarak tanımlanabilen her 6 sağlıklı bireyin en az birinde AIEC'nin ileuma kolaylıkla kolonize olabildiğini desteklemektedir (Martinez-Medina ve ark. 2014). Dolayısıyla bulgularımız yukarıda verilen önceki çalışmalar da göz önüne alındığında sağlıklı örneklerde bu ırkın yerleşim yeri olarak ileum bölgesini tercih ettiğine dair önemli ipuçları sunmaktadır.

Diğer taraftan CR ve ileum IR bölgelerinden alınan mukozal içeriklerle hazırlanan BSM ortamını içeren hücre kültür ortamlarıyla yaptığımız hücre enfeksiyon deneyleri, LF82'nin farklı ortamlardaki adhesiv ve invaziv özelliklerinin kontrole göre oldukça farklı olduğunu gösterdi. Üstelik bu farklılık her iki fare ırkında da benzer ve birbirini destekler nitelikteydi (Şekil 4.9 ve 4.10.).

LF82'nin adhesiv özellikleri incelendiğinde CR bölgesinden hazırlanan ortamında oldukça farklı bir sonuç olduğu görüldü. LF82'nin CR bölgesinden hazırlanan ortamda hücrelere, kontrole göre daha fazla bir oranda yapıştığı gözlemlendi. Keza kontrolün adezyon oranı % 100 kabul edildiğinde bu oran, FVB/N farelerinde % 161 ± 32 iken Balb/c farelerinde % 211 ± 10 idi. IR ortamında ise, LF82'nin kontrole daha düşük oranlarda hücrelere yapıştığı görüldü: Kontrolün adezyon oranı % 100 kabul edildiğinde FVB/N farelerinde adezyon oranının % 19 ± 17 , Balb/c farelerinde ise bu oranın % 54 ± 8 olduğu görüldü (Çizelge 4.2., Şekil 4.3.; Çizelge 4.4, Şekil 4.6.).

LF82'nin farklı ortamlardaki invasiv özelliklerine bakıldığında CR bölgesinden hazırlanan ortamda, hücre enfeksiyon periyodundan sonra kontrole göre daha düşük seviyelerde intraselüler LF82 varlığı saptandı. Diğer taraftan IR bölgesinden hazırlanan ortamda kontrole göre oldukça düşük seviyelerde intraselüler LF82 varlığına rastlanıldı. Keza en düşük intraselüler LF82 oranı, IR ortamına aitti. FVB/N farelerinde kontrolün invazyon oranı % 100 kabul edildiğinde CR ortamındaki intraselüler LF82 oranı % 55 ± 7 iken, IR ortamında ihmal edilecek seviyede koloni sayıldığından bu oran sonuçlara % 0 olarak yansdı. Balb/c farelerinde de farklılık benzerdi. Balb/c fareleri için kontrolün invazyon oranı % 100 kabul edildiğinde CR ortamındaki intraselüler LF82 oranı % 30 ± 3 iken IR ortamında bu oran yalnızca % 4.3 ± 2 idi (Çizelge 4.3., Şekil 4.5.; Çizelge 4.5., Şekil 4.8.).

Adezyon ve invazyon deneylerinden elde ettiğimiz bulgular oldukça ilgi çekiciydi. Kolon bölgesinden elde edilmiş mukozal içerikle hazırlanan BMSM ortamını içeren hücre kültür ortamına ait adezyon sonuçları hariç, LF82'nin adezyon ve invazyon oranlarının kontrole göre her iki BMSM ortamını içeren kültür ortamlarında da (kolon ve ileum) ciddi şekilde düşüş gösterdiğini gördük. Bu düşüş oranlarına bakıldığında en düşük adezyon ve invazyon oranının IR ortamına ait olduğunu gördük. CR ortamının da IR ortamı kadar olmasa da kontrolden daha düşük bir invazyon değerine sahip olduğu görüldü. Diğer taraftan invazyon değerlerinin aksine CR ortamının, en yüksek adezyon değerine sahip olduğu görüldü.

Adezyon ve invazyon sonuçlarının bu şekilde olmasının nedenleri sonraki çalışmalarla araştırılacaktır. Ancak sonuçlardan özellikle invazyon verilerinde BMSM ortamlarını içeren hücre kültür ortamlarında enfeksiyon periyodundan sonra saptanan düşük intraselüler LF82 oranlarının, bakterinin hücrelere yapışmasına ve invaze etmesine aracılık eden type-1 pili ve/veya long polar fimriae (lpf)'nın, BMSM ortamlarında bulunan reseptörler tarafından tutulmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Keza sonraki çalışma oligomannozil ve GP2 gibi reseptörlerin, BMSM ortamlarında immunolojik olarak taranması üzerine olacaktır. Çünkü bakterinin bu iki elemanından type-1 pili, aynı zamanda musinde bulunan oligomannozil gruplarına bağlanır. Keza patolojik olarak AIEC ırklarına oldukça yakın EHEC ırkının musine N-bağlı bir oligosakkarid olan 118 kDa'luk oligomannozil guruplarına type-1 pili aracılığıyla bağlanabildiği saptanmıştır (Sajjan ve Forstner 1990). Lpf ise bakterinin

lenfoid dokulara geçmede kullandığı M hücreleri üzerindeki GP2 glikoproteinlerine bağlanır (Chassaing ve ark. 2011). Anlamlı bir şekilde, IR ortamına ait adezyon ve invazyon sonuçlarının oldukça düşük değerlerde olması, intestinal mukozada hem kolon hem de ince bağırsaktaki ortak mukus bileşeni olan MUC2'ye N-bağlı oligosakkaridlerden biri olan mannozil oligosakkaridinin yanı sıra sadece ileum bölgesinde bulunan M hücreleri üzerindeki GP2 glikoprotein reseptörlerinin varlığından ileri geliyor olabilir. Tabii bunların dışında başka spesifik reseptör-ligand etkileşimleri de meydana gelmiş olabilir. Diğer taraftan çalışmayla ilgili yapılan literatür taramasında çalışmaya en yakın bir dizi çalışma bulunmuştur. Bunlardan belki de en dikkat çekici olanı ticari musin kullanılarak gerçekleştirilen çalışmadır. I-407 ve *Caco-2* hücre hatlarının kullanıldığı bu çalışmada hücreler *E.coli* C25 ırkı ile enfekte edilmeden önce hücre kültür ortamına belli oranlarda musin eklenmiştir. Enfeksiyon periyodundan sonra elde edilen sonuçlar her iki hücre hattında da musinin, kontrole göre bakteriyel translokasyonu güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüş ve bakteriyel pili'nin musin bağlı oligosakkarit birimleri tarafından hücrelere ulaşmadan alıkondduğu sonucuna varılmıştır (Gork ve ark. 1999). Bu sonucu destekleyen bir başka çalışmada, musine bağlı olarak bulunabilen mannoz oligosakkaridinin LF82 bakterisinin adezyonu ve invazyonundaki rolü, I-407 hücre hattının kullanıldığı hücre enfeksiyon deneyleriyle araştırılmıştır. Hücre enfeksiyonundan önce ortama %2 oranında eklenen D-mannoz veya metil- α -D-mannopiranozidin 3 saatlik hücre enfeksiyon periyodundan sonra kontrole göre LF82'nin adezyonunu sırasıyla %96.1 ve %99.8 oranında inhibe ettiği, gentamisin muamelesini takiben ek 1 saatlik inkübasyondan sonra ise D-mannoz veya metil- α -D-mannopiranozidin, bakterinin invazyonunu sırasıyla %99.7 ve %99.8 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Sonuçlar, LF82'nin intestinal epitelyum hücrelerine type-1 pili aracılığıyla yapışabileceğini ve bunun büyük oranda type-1 pili/mannozil etkileşimi üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Boudeau ve ark. 2001). Keza yapmış olduğumuz çalışma da hazırladığımız ortamlarda LF82 bakterisinin adezyon ve invazyonu I-407 hücre hattı kullanılarak araştırıldı ve sonuçların benzer izler taşıdığı görüldü.

Daha önce değinilen GFP (Green Flouresan Protein) içeren plazmitlere sahip LF82 ırkları ile yapılan çalışmada güçlü bir gut kolonizasyonu görülmesine rağmen, bakterilerin lümende kaldığı ve intestinal epitelyum hücrelerine yapışmadığı tespit

edilmiştir (Simonsen ve ark. 2011). Bu çalışmadan elde edilen yüksek orandaki gut kolonizasyonuna rağmen, LF82'nin lümende kalması ile ilgili bulgu, bakterinin mukozal bariyer tarafından alıkonulmuş olabileceğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Bir diğer benzer çalışmada Yeni Zellanda beyaz tavşanından izole edilen ve ultrasantrifügasyonla saflaştırılan ileal ve kolonik musinin, *E. coli* RDEC1'in polisistren kuyucuklara ve enterosit mikrovilluslarına yapışmasını bloke ettiği ortaya konmuştur. Bu bakterinin hücrelere yapışma elemanı AF/Rl pili'nin musindeki glikoprotein birimleri tarafından tutulduğu sonucuna varılmış çünkü bunun pili bulundurmeyen M34 izojenik mutantının polisistren kuyucuklara yapışamadığı görülmüştür. Şaşırtıcı bir şekilde bakteri yerleşim yeri olarak ileumda bulunmasına rağmen, *E. coli* RDEC1 bağlanmasının, ileuma ait musine nazaran kolonik musin tarafından daha yüksek bir oranda inhibe edildiği görülmüştür (Drumm ve ark. 1988, Mack ve Sharman 1991). Oysaki mevcut çalışmadan elde ettiğimiz veriler CR ortamının LF82'nin bakteriyel adezyonunu inhibe etmediğini, aksine en yüksek adezyon oranının CR ortamında olduğunu göstermektedir. BSM ortamına ait komponentlerin LF82'nin I-407 hücrelerine bağlanmasını bir şekilde bloke ettiği düşünülürse, CR ortamında LF82'nin adezyon kapasitesini bloke edebilen reseptörlerden ziyade bakterinin I-407 hücrelerine daha yüksek bir oranda yapışmasına neden olan bir ortamın olduğu söylenebilir. Bu sonuç CR ortamında LF82'yi alıkoyabilecek özgün reseptörlerin bulunmadığı ya da çok az oranda bulunduğu dolayısıyla CR ortamının LF82 için çok da tanıdık bir yerleşim yeri olmadığı algısını uyandırmaktadır. Ancak bunun sonraki çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir. Diğer taraftan, IR ortamında, bakterinin adezyon oranının kontrole nazaran neredeyse yarı yarıya düştüğü görüldü.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulguları diğer çalışmalarla da değerlendirdiğimizde AIEC ırkı LF82'nin, sağlıklı dokularda yerleşim yeri olarak ileum bölgesini tercih ettiğine dair ipuçları elde ettik. Ayrıca hem bakteriyel kültür sonuçlarının hem de adezyon ve invazyon sonuçlarının her bir bölgeye göre farklı oranlarda olması BSM ortamlarında LF82 ile özgün reseptör-ligand etkileşimlerinin meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda ilerleyen çalışmalarda bu etkileşimler belirlenebilirse LF82'nin saptanmasını kolaylaştıran özgün moleküller ortaya çıkarılabilir. Bu ırkın Crohn hastalarında inflamasyonlu bölgelerdeki yüksek

yoğunluğu göz önüne alınınca belki de bu yolla hastalığa özgü yeni terapotik hedefler bulunabilecektir. Ancak öncelikle, elde ettiğimiz bulgularla ilgili belirttiğimiz olası nedenleri yukarıda sözünü ettiğimiz immünolojik temelli bir dizi çalışmayla da desteklememiz gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adenis, A., Colombel, JF., Lecouffe, P., Wallaert, B., Hecquet, B., Marchandise, X., Cortot, A. 1992. Increased pulmonary and intestinal permeability in Crohn's disease. *Gut*,33: 678-682.
- Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E., Barnich, N. 2014. Understanding Host-Adherent-Invasive *Escherichia coli* Interaction in Crohn's Disease: Opening Up New Therapeutic Strategies. *BioMed Research International*, Article ID: 567929, 16 p.
- Akobeng, AK., Thomas, AG. 2007. Enteral nutrition for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD005984.
- Allen, A., Flemstrom, G. 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*,288:C1–C19.
- Ambort, D., et al. 2012. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109:5645–5650.
- Ambrose, NS., Johnson, M., Burdon, DW., Keighley, MR. 1984. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg.*, 71(8):623–5.
- Amendola, A., Butera, A., Sanchez, M., Strober, W., Boirivant, M. 2014. Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms. *Mucosal Immunol.*, 7: 391-404.
- Anonim. 2016_a. Crohn's disease. Erişim:[http://www.thegastrosurgeon.com/wpcontent/uploads/2014/11/crohns_disease.jpg]. Erişim Tarihi: 11.07.2016.
- Anonim. 2016_b. Anatomy and Histology of The Small and Large İntestine. Erişim:[<http://jpck.zju.edu.cn/jcyxjp/files/ge/05/MT/0511.pdf>]. Erişim Tarihi: 12.07.2016
- Anonim. 2016_c. Enterocytes. Erişim: [<https://quizlet.com/12743043/bio-digestive-system-flash-cards/>]. Erişim Tarihi: 13.07.2016.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, DR., Fernandes, GR., Tap, J., Bruls, T., Batto, JM., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M.,

Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, EG., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, WM., Brunak, S., Doré, J., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, HM., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, KU., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, SD., Bork, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473: 174-180.

Atuma, C., Strugula, V., Allen, A., Holm, L. 2001; The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol.*, 280:G922–G929.

Audie, JP., et al. . 1993. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*,41:1479–1485.

Ayabe, T., Satchell, DP., Wilson, CL., Parks, WC., Selsted, ME., Ouellette, AJ. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol.*,1: 113-118.

Backhed, F.,Ley, R. E., Sonnenburg,J. L., Peterson, D A., Gordon,JI .2005.Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717): 1915–1920.

Barnich, N., Carvalho, FA., Glasser, AL., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, JF., Darfeuille-Michaud, A. 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest.*,117: 1566-1574.

Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A. 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 23: 16–20.

Barrett, JC., Hansoul, S., Nicolae, DL., Cho, JH., Duerr, RH., Rioux, JD., Brant, SR., Silverberg, MS., Taylor, KD., Barnada, MM., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, LW., Green, T., Griffiths, AM., Kistner, EO., Murtha, MT., Regueiro, MD., Rotter, JI.,

Schumm, LP., Steinhart, AH., Targan, SR., Xavier, RJ.; NIDDK IBD Genetics Consortium. Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, JP., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E.; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium. Cardon, LR., Anderson, CA., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, NJ., Onnie, CM., Fisher, SA., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, CG., Parkes, M., Georges, M., Daly, MJ. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 40: 955-962.

Basso, P.J., Fonseca, M.T.C., Bonfa, G., Alves, V.B.F., Sales-Campos, H., Nardini, V., Cardoso, CRB. 2014. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(9): 727-737.

Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, RH., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, SG., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., Simpson, KW. 2007. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*, 1: 403-418.

Baxter PS, et al. 1989. Abnormal jejunal potential difference in cystic fibrosis. *Lancet*, 333:464-466.

Bennett, EP., et al. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22:736-756.

Benjamin, J., Makharia, GK., Ahuja, V., Kalaivani, M., Joshi, YK. 2008. Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *WorldJ Gastroenterol*, 14: 1399-1405.

Bergstrom, KSB., et al. 2010. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog*, 6:e1000902.

- Bhaskar KR, et al. 1992. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature*, 360:458–461.
- Bharucha, AE., Camilleri, M. 2007. Physiology of the colon and its measurement. Peters, JH., Pemberton, JH., Yeo, CJ., Dempsey, DT., Klein, AS. Shackelford's surgery of the alimentary tract. Saunders, Philadelphia.
- Birmingham, CL., Brumell, JH. 2006. Autophagy recognizes intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in damaged vacuoles. *Autophagy*, 2: 156-158.
- Bobek, LA., Tsai, H., Biesbrock, AR., Levine, MJ. 1993. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J. Biol.Chem.*, 268:20563–20569.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., Darfeuille-Michaud, A.1999. Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. *Infection and Immunity*, 67(9): 4499-4509.
- Boudeau, J., Barnich N., Darfeuille-Michaud, A. 2001. Type-1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39(5): 1272-1284.
- Brandtzaeg, P., Carlsen, HS., Halstensen, TS. 2006. The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol.*, 579: 149-167.
- Bringer, MA., Barnich, N., Glasser, AL., Bardot, O., Darfeuille- Michaud, A. 2005. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*, 73: 712-721.
- Bringer, MA., Glasser, AL., Tung, CH., Méresse, S., Darfeuille-Michaud, A. 2006. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*, 8: 471-484.
- Bringer, MA., Rolhion, N., Glasser, AL., Darfeuille-Michaud, A. 2007. The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J Bacteriol*, 189: 4860-4871.

- Buisine, MP., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, MC., Colombel, JF., Porchet, N., et al. 2001. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut*, 49:544-551.
- Caldara, M., et al. 2012. Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state. *Curr. Biol.*, 22:2325–2330.
- Cario, E., Podolsky, DK. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.*, 68: 7010-7017.
- Carrière, J., Darfeuille-Michaud, A., Thu Nguyen, HT. 2014. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.*, 20(34): 12102-12117.
- Carvalho, FA., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., Darfeuille-Michaud, A. 2008. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis*, 14: 1051-1060.
- Carvalho, FA., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, CH., Stanners, CP., Darfeuille-Michaud, A. 2009. Crohn's disease adherent- invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med.*, 206: 2179-2189.
- Coulombe, F., Divangahi, M., Veyrier, F., et al. 2009. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med.*, 206:1709-16.
- Chapman-Kiddell, CA., Davies, PSW., Gillen, L., et al. 2010. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 16:137–51.
- Chargui, A., Cesaro, A., Mimouna, S., Fareh, M., Brest, P., Naquet, P., Darfeuille-Michaud, A., Hébuterne, X., Mograbi, B., Vouret- Craviari, V., Hofman, P. 2012. Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One*, 7: e51727.
- Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. 2013. The σ E pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 195: 76-84.

- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., Darfeuille- Michaud, A. 2013. Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *EnvironMicrobiol.*,15: 355-371.
- Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, FA., Ley, RE., Gewirtz, AT. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* 2014; 63: 1069-1080.
- Chassaing, B., Rolhion., N., de Vallée, A., Salim, SY., Prorok- Hamon, M., Neut, C., Campbell, BJ., Söderholm, JD., Hugot, JP., Colombel, JF., Darfeuille-Michaud, A. 2011. Crohn disease—associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest.*,121: 966-975.
- Christl, SU., Scheppach, W. 1997. Metabolic consequences of total colectomy. *Scand J Gastroenterol*, 32 (222): 4-20.
- Chu, H., et al. 2012; Human defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science*, 337:477–481.
- Clarke, DJ., Chaudhuri, RR., Martin, HM., Campbell, BJ., Rhodes, JM., Constantinidou, C., Pallen, MJ., Loman, NJ., Cunningham, AF., Browning, DF., Henderson, IR. 2011. Complete genome sequence of the Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* strain HM605. *J Bacteriol.*,193:4540.
- Conte, MP., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O., Cucchiara, S. 2006. Gut associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 55: 1760-1767.
- Cooke, HJ. Regulation of colonic transport by the autonomic nervous system. Phillips, SF., Pemberton, JH., Shorter, RG. 1991. The large intestine: physiology, pathophysiology, and disease. Raven Press, 79-169, New York.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P.,et al. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cellsinfluencing bacterial handling and antigen presentation. *NatMed.*, 16: 90-97.

- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De, AA., Haesler, R., et al. 2013. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest.*, 123: 700-711.
- Cottone, M., Rosselli, M., Orlando, A., et al. 1994. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 106:643-8.
- Craven, M., Egan, CE., Dowd, SE., McDonough, SP., Dogan, B., Denkers, EY., Bowman, D., Scherl, EJ., Simpson, KW. 2012. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease. *PLoS One.*, 7: e41594.
- Curová, K., Kmetová, M., Sabol, M., Gombosová, L., Lazúrová, I., Siegfried, L. 2009. Enterovirulent *E. coli* in inflammatory and noninflammatory bowel diseases. *Folia Microbiol (Praha)*, 54: 81-86.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, JB., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 14691-14696.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, AL., Barnich, N., Bringer, MA., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, JF. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127: 412-421
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Colombel, JF. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 115: 1405-1413.
- Deloose, E., Janssen, P., Depoortere, I., Tack, J. 2012. The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 9:271–285.
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, HF., Stanners, CP., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N. 2012. Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis.*, 18: 294-304.

- Desreumaux, P., Ernst, O., Geboes, K., et al. 1999. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 117:73–81.
- Dogan, B., Scherl, E., Bosworth, B., Yantiss, R., Altier, C., Mc-Donough, PL., Jiang, ZD., Dupont, HL., Garneau, P., Harel, J., Rishniw, M., Simpson, KW. 2013. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 19: 141-150.
- Drouet, M., Vignal, C., Singer, E., Djouina, M., Dubreuil, L., Cortot, A., Desreumaux, P., Neut, C. 2012. AIEC colonization and pathogenicity: influence of previous antibiotic treatment and preexisting inflammation. *Inflamm Bowel Dis.*, 18: 1923-1931.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., et al. 2013. Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathog*, 9(1): e1003141.
- Drumm, B., Robertson, A.M., Sherman, P.M. 1988. Inhibition of Attachment of *Escherichia coli* RDEC-1 to Intestinal Microvillus Membranes by Rabbit Ileal Mucus and Mucin In Vitro. *Infection and Immunity*, 56 (9): 2437-2442.
- Dumas, ME., Barton, RH., Toye, A., et al. 2006. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33): 12511–12516.
- Dunne, KA., Allam, A., McIntosh, A., Houston, SA., Cerovic, V., Goodyear, CS., Roe, AJ., Beatson, SA., Milling, SW., Walker, D., Wall, DM. 2013. Increased S-nitrosylation and proteasomal degradation of caspase-3 during infection contribute to the persistence of adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) in immune cells. *PLoS One*, 8: e68386.
- Eaves-Pyles, T., Allen, CA., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, CB., Jezek, GE., Islas-Islas, M., Torres, AG. 2008. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol.*, 298: 397-409.

Eckburg, PB., Bik, EM., Bernstein, CN., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, SR., Nelson, KE., Relman, DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635-1638.

Elliott, TR., Hudspith, BN., Wu, G., Cooley, M., Parkes, G., Quiñones, B., Randall, L., Mandrell, RE., Fagerquist, CK., Brostoff, J., Rayment, NB., Boussioutas, A., Petrovska, L., Sanderson, JD. 2013. Quantification and characterization of mucosa-associated and intracellular *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*,19: 2326-2338.

Else, KJ., Finkelman, FD. 1998. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int. J.Parasitol.*, 28:1145–1158.

Franke, A., McGovern, DP., Barrett, JC., Wang, K., Radford-Smith, GL., Ahmad, T., Lees, CW., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, CA., Bis, JC., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, EM., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., Latiano, A., Mathew,CG., Montgomery, GW., Prescott, NJ., Raychaudhuri,S., Rotter, JI., Schumm, P., Sharma, Y., Simms, LA., Taylor, KD., Whiteman, D., Wijmenga, C., Baldassano, RN., Barclay, M., Bayless, TM., Brand, S., Büning, C., Cohen, A., Colombel, JF., Cottone, M., Stronati, L., Denson, T., De Vos, M., D’Inca, R., Dubinsky, M., Edwards, C., Florin, T., Franchimont, D., Gearry, R., Glas, J., Van Gossum, A., Guthery, SL., Halfvarson, J., Verspaget, HW., Hugot, JP., Karban, A., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., Mowat, C., Newman, W., Panés, J., Phillips, A., Proctor, DD., Regueiro, M., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Seibold, F., Steinhardt, AH., Stokkers, PC., Torkvist, L., Kullak-Ublick, G., Wilson, D., Walters, T., Targan, SR., Brant, SR., Rioux, JD., D’Amato, M., Weersma, RK., Kugathasan, S., Griffiths, AM., Mansfield, JC., Vermeire, S., Duerr, RH., Silverberg, MS., Satsangi, J., Schreiber, S., Cho, JH., Annese, V., Hakonarson, H., Daly, MJ., Parkes, M. 2010. Genome-wide metaanalysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’ s disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42: 1118-1125.

Frank, DN., St Amand, AL., Feldman, RA., Boedeker, EC., Harpaz, N., Pace, NR. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 13780-13785.

Fritz,T.,Niederreiter, L., Adolph,T., Blumberg, RS., Kaser, A. 2011.Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stres converge. Gut, 60:1580-1588.

Frolkis AD, Dykeman J, Negron ME, et al. Risk of surgery for infl ammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. Gastroenterology 2013; 145: 996–1006.

Ganong, WF. 2003. Regulation of gastrointestinal function. Barret, KE., Boitano S., Barman, SM., Brooks, HL. Review of medical physiology. McGraw-Hill, 483-517, New York.

Gerova, VA., Stoynov, SG., Katsarov, DS., Svinarov, DA. 2011. Increased intestinal permeability in inflammatory boweldiseases assessed by iohexol test. World J Gastroenterol., 17: 2211-2215.

Gill, SR., Pop, M., Deboy, RT., Eckburg, PB., Turnbaugh, PJ.,Samuel, BS., Gordon, JI., Relman, DA., Fraser-Liggett, CM.,Nelson, KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gutmicrobiome. Science, 312: 1355-1359.

Glasser, AL., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, MH., Colombel, JF., Darfeuille-Michaud, A. 2001. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. Infect Immun, 69: 5529-5537.

Godl, K., et al. 2002. The N-termini of the MUC2 mucin form trimers that are held together within atrypsin-resistant core fragment. J. Biol. Chem., 277:47248–47256.
Lidell, ME., et al. 2003. The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in CHOcells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells. Biochem. J., 372:335–345.

Gork, A.S., Usui, N., Ceriati, E., Drongowski, R.A., Epstein, M.D., Coran, A.G., Harmon, C.M. 1999. The effect of mucin on bacterial translocation in I-407 fetal and Caco-2 adult enterocyte cultured cell lines. Pediatr Surg Int., 15: 155-159.

Gum, JR., Hicks, JW., Toribara, NW., Siddiki, B., Kim, YS. 1994. Molecular cloning of human intestinalmucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. J. Biol. Chem., 269:2440–2446.

- Gutierrez, MG., Master, SS., Singh, SB., Taylor, GA., Colombo, MI., Deretic, V. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 119: 753-766.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., et al. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor kappa B activation. *J Biol Chem*, 277:41701-5.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, FM., Briggs, J., Günther, S., Prescott, NJ., Onnie, CM., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, UR., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, CG., Krawczak, M., Schreiber, S. 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.*, 39: 207-211.
- Hansson, GC., Johansson, MEV.2010. The inner of the two Muc2 mucin dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes.*, 1(1): 51–54.
- Harrell, LE., Chang, EB. 2006. Intestinal water and electrolyte transport. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, disease, management.* Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Harvey, RA. Innate Immune Function. 2013. Doan, T., Roger, M., Susan, v., Carl, W. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Wolters Kluwer, 42-57, Philadelphia.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, GS., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, SI., Lowe, AW., Itoh, K., KiyonoH., Ohno, H. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462(7270):226–230.
- Hatrup, CL., Gendler, SJ. 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Ann. Rev. Physiol.*, 70:431–457.
- HO, SB., et al. 1995. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology*, 109:735–747.
- HO, SB., et al. 2004. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.*, 49:1598–1606.

- Hollingsworth, MA., Swanson, BJ. 2004. Mucin in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat.Rev. Cancer.*, 4:45–60.
- Hooper, LV., Littman, DR., Macpherson, AJ. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336: 1268-1273.
- Hugot, JP., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, JP.,Belaiche, J., et al. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeatvariants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature*, 411: 599-603.
- Ishikawa, N., Horii, Y., Nawa, Y. 1993.Immune-mediated alteration of the terminal sugars of goblet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *Immunology*,8:303–307.
- Ishikawa, N., Wakelin, D., Mahida, YR. 1997. Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*, 113:542–549.
- Janet, C., Haiging, T., Mazmanian S.K. 2011. Pathobionts of Gastrointestinal Microbiota and Inflammatory Disease. *Curr Opin Immunol.*, 23(4): 473-480.
- Jarczak, J., Kościuczuk, EM., Lisowski, P., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E. 2013. Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum Immunol.*,74: 1069-1079.
- Jenkins, RT., Jones, DB., Goodacre, RL., Collins, SM., Coates, G., Hunt, RH., Bienenstock, J. 1987. Reversibility of increased intestinal permeability to 51Cr-EDTA in patients with gastrointestinal inflammatory diseases. *Am J Gastroenterol.*,82: 1159-1164.
- Jenkins, RT., Ramage, JK., Jones, DB., Collins, SM., Goodacre, RL., Hunt, RH. 1988. Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clin Invest Med.*,11: 151-155.
- Jensen, PH., Kolarich, D., Packer, NH. 2010. Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together.*FEBS J.*, 277:81–94.
- Jensen, SR., Fink, LN., Nielsen, OH., Brynskov, J., Brix, S. 2011. Ex vivo intestinal adhesion of *Escherichia coli* LF82 in Crohn’s disease. *Microb Pathog.*,51: 426-431.

- Jiang, W., Wang, X., Zeng, B., Liu, L., Tardivel, A., Wei, H., et al. 2013. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med.*, 210: 2465-2476.
- Johansson, MEV. 2012. Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins. *PLoS ONE*, 7:e41009.
- Johansson, MEV., et al. 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol. Life Sci.*, 68:3535–3641.
- Johansson, MEV., Hansson, GC. 2011. Keeping bacteria at a distance. *Science*, 334:182–183.
- Johansson, M., Synnerstad, I., Holm, L. 2000. Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach. *Gastroenterology*, 119:1297–1304.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, RK., Duerr, RH., McGovern, DP., Hui, KY., Lee, JC., Schumm, LP., Sharma, Y., Anderson, CA., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, SL., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., Abraham, C., Achkar, JP., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, AN., Andersen, V., Andrews, JM., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, PA., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Büning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., De Jong, D., Devaney, KL., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, BD., Ferguson, LR., Franchimont, D., Fransen, K., Gearry, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Haritunians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, TH., Kupcinskas, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrance, IC., Lees, CW., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, AR., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, CY., Potocnik, U., Prescott, NJ., Rigueiro, M., Rotter, JI., Russell, RK., Sanderson, JD., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, LA., Sventoraityte, J., Targan, SR., Taylor, KD., Tremelling, M., Verspaget, HW., De Vos, M., Wijmenga, C., Wilson, DC., Winkelmann, J., Xavier, RJ., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, CK., Zhao, H.; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC). Silverberg, MS., Annesse, V., Hakonarson, H., Brant, SR., Radford-Smith, G., Mathew, CG., Rioux, JD., Schadt, EE., Daly, MJ., Franke, A., Parkes, M., Vermeire, S., Barrett, JC., Cho, JH. 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491: 119-124

- Junquera, LC., Carneiro, J., Kelly, RO. 1989. Digestive tract. Junquera, LC., Carneiro, J., Kelly, RO. Basic histology. Appleton-Lange, 282-311, New York.
- Kanneganti, TD., Lamkanfi, M., Nunez, G. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 27:549-59.
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, RS. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.*, 28: 573-621.
- Kawada, M., Chen, CC., Arihiro, AA., Nagatani, K., Watanabe, T., Mizoguchi, E. 2008. Chitinase 3-like-1 enhances bacterial adhesion to colonic epithelial cells through the interaction with bacterial chitin-binding protein. *Laboratory Investigation*, 88: 883-895.
- Keita, A.V., Söderholm, J.D. 2012. Barrier dysfunction and bacterial uptake in the follicle-associated epithelium of ileal Crohn's disease. *Ann. N.Y. Acad., Sci.* 1258: 125–134.
- Khan, SH., Aguirre, A., Bobek, LA. 1998. In-situ hybridization localized MUC7 mucin gene expression to the mucous acinar cells of human and MUC7-transgenic mouse salivary glands. *Glycoconj. J.*, 15:1125–1132.
- Kim, YS., HO, SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 12:319–330.
- Kinross, JM., Von Roon, AC., Holmes, E., Darzi, A., Nicholson, JK. 2008. The human gut microbiome: implications for future health care. *Current Gastroenterology Reports*, 10(4): 396–403.
- Kobayashi, K., Qiao, SW., Yoshida, M., Baker, K., Lencer, WI., Blumberg, RS. 2009. An FcRn-dependent role for anti-flagellin immunoglobulin G in pathogenesis of colitis in mice. *Gastroenterology*, 137: 1746-1756.
- Koninkx, JF., Mirck, MH., Hendriks, HG., Mouwen, JM., van Dijk, JE. 1988. *Nippostrongylus brasiliensis*: histochemical changes in the composition of mucins in goblet cells during infection in rats. *Exp. Parasitol.*, 65:84–90.
- Kotlowski, R., Bernstein, CN., Sepehri, S., Krause, DO. 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, 56: 669-675.

- Krause, DO., Little, AC., Dowd, SE., Bernstein, CN. 2011. Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue. J Bacteriol.,193: 583.
- Kumar, PJ., Clark, ML. 2001. Gastroenterology. Kumar, PJ., Clark, ML. Clinical Medicine. Saunders, 246-260,USA.
- Landers, CJ., Cohavy, O., Misra, R., Yang, H., Lin, YC., Braun, J., Targan, SR. 2002. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. Gastroenterology, 123: 689-699.
- Lang, T., Hansson, GC., Samuelsson, T. 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution.Proc. Natl Acad. Sci. USA. 104:16209–16214.
- Lapaquette, P., Bringer, MA., Darfeuille-Michaud, A. 2012.Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased proinflammatory response. Cell Microbiol.,14: 791-807.
- Lapaquette, P., Glasser, AL., Huett, A., Xavier, RJ., Darfeuille- Michaud, A. 2010. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. Cell Microbiol, 12: 99-113.
- Larsson JM, Karlsson H, Sjoval H, Hansson GC. 2009. A complex, but uniform O-glycosylation of thehuman MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. Glycobiology, 19:756–766.
- Lee, JC., Parkes, M. 2011. Genome-wide association studies and Crohn's disease. Brief Funct Genomics, 10: 71-76.
- Ley, RE., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, PJ., Ramey, RR., Bircher, JS., Schlegel, ML., Tucker, TA., Schrenzel, MD., Knight, R., Gordon, JI. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. Science, 320: 1647-1651.
- Lim, CS., Moon, W., Ja Park, S., In Park, M., Hun Kim, H., Bin Kim, J., Moon Choi, J., Chang, HK., Lee, SH. 2013.A Rare Case of Free Bowel Perforation Associated with Infliximab Treatment for Stricturing Crohn's Disease. Korean J Gastroenterol, 62(3): 169-173.

- Loftus EV, Schoenfeld P, Sandborn WJ, et al. 2002. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population based patient cohorts from North America: a systemic review. *Aliment Pharmacol Ther*, 16:51-60.
- Low, D., Tran, HT., Lee, IA., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, HC., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., Mizoguchi, E. 2013. Chitin-Binding Domains of *Escherichia coli* chiA Mediate Interactions With Intestinal Epithelial Cells in Mice with Colitis. *Gastroenterology*, 145(3): 602–612
- Liu, Z., Lee, J., Krummey, S., Lu, W., Cai, H., Lenardo, MJ. 2011. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol.*, 12: 1063-1070.
- Macao, B., Johansson, DGA., Hansson, GC., Härd, T. 2006. Auto-proteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13:71–76.
- Mack, D.R., Sherman, P.M. 1991. Mucin Isolated from Rabbit Colon Inhibits In Vitro Binding of *Escherichia coli* RDEC-1. *Infection and Immunity*, 59 (3): 1015-1023.
- Maloy, KJ., Powrie, F. 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474:298-306.
- Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, EO., Fromm, M., et al. 2000. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci.*, 113(11): 2085-2090.
- Martin, HM., Campbell, BJ., Hart, CA., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, HF., Rhodes, JM. 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127: 80-93.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., Garcia-Gil, LJ. 2006. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis*, 12: 1136-1145.
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, Gonzalez-Huix F, Lopez- Oliu C, et al. (2009) Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological

evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis

Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N. 2014. Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. Gut, 63:116–124.

Martinez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., López, C., Alonso, MP., Bonacorsi, S., Nicolas-Chanoine, MH., Darfeuille-Michaud, A., Garcia-Gil, J., Blanco, J. 2009. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. J Clin Microbiol., 47: 3968-3979.

Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldegue, X., Blanco, JE., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., Garcia-Gil, LJ. 2009. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). BMC Microbiol.,9: 202.

Mazmanian, S K.,Round,J. L., Kasper,DL.2008.A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature, 453(7195): 620–625.

Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payré, B., Al Saati, T., Capilla, F., Desreumaux, P., Darfeuille-Michaud, A., Altare, F. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. Cell Microbiol, 9: 1252-1261.

Mei L, Targan SR, Landers CJ, Dutridge D, Ippoliti A, Vasilias EA, Papadakis KA, Fleshner PR, Rotter JI, Yang H. 2006. Familial expression of anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease.Gastroenterology,130: 1078-1085.

Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. 2006. Intracellular pattern recognitionreceptors in the host response. Nature, 442:39-44.

McGovern, D., Powrie, F. 2007. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. Gut,56: 1333-1336.

McKay, DM., et al. 1990. *Hymenolepis diminuta*: intestinal goblet cell response to infection in male C57mice. Exp. Parasitol., 71:9–20.

Michail, S., Bultron, G., De Paolo, RW. 2013. Genetic variants associated with Crohn's disease. *The Application of Clinical Genetics*, 6: 25–32.

Mimouna, S., Gonçalves, D., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., Hofman, P., Vouret-Craviari, V. 2011. Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes*, 2: 335-346.

Miquel, S., Claret, L., Bonnet, R., Dorboz, I., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A. 2010. Role of decreased levels of Fis histonelike protein in Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J Bacteriol*, 192: 1832-1843.

Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb el, H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., Neut, C., Colombel, JF., Medigue, C., Mojica, FJ., Peyret, P., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A. 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One*, 5: e12714.

Mondot, S., Kang, S., Furet, JP., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Doré, J., Leclerc, M. 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis.*, 17: 185-192.

Moore, ME., Boren, T., Solnick, JV. 2011. Life at the margins: modulation of attachment proteins in *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes*, 2: 42–46.

Mylonaki, M., Rayment, NB., Rampton, DS., Hudspith, BN., Brostoff, J. 2005. Molecular characterization of rectal mucosa associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 11: 481-487.

Naser, S.A., Arce M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., Thanigachalam, S. 2012. Role of ATG16L, NOD2 and IL23 in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol.*, 18(5): 412-424.

Nash, JH., Villegas, A., Kropinski, AM., Aguilar-Valenzuela, R., Konczy, P., Mascarenhas, M., Ziebell, K., Torres, AG., Karmali, MA., Coombes, BK. 2010. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*, 11: 667.

- Nature.2010_a.CellJunctions.Erişim:[http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14714296/U4CP5-2_CellJunctions.jpg].ErişimTarihi: 12.07.2016.
- Nature.2010_b.Immuneadaptations.Erişim:[<http://www.nature.com/nri/journal/v10/n3/images/nri2710-f3.jpg>]. Erişim Tarihi: 13.07.2016.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membré, JM., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H., Colombel, JF. 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. Am J Gastroenterol, 97: 939-946.
- Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Clausen H. 1996. Differential expression of human highmolecular-weight salivary mucin (MG1) and low-molecular-weight salivary mucin (MG2). J.Dental Res., 75:1820–1826.
- Nieminen, JK., Sipponen, T., Färkkilä, M., Vaarala, O. 2014. Monocyte- derived dendritic cells from Crohn's disease patients exhibit decreased ability to activate T helper type 17 responses in memory cells. Clin Exp Immunol.,177: 190-202.
- Niess, JH., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, BA., et al. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to theintestinal lumen and bacterial clearance. Science, 307:254-258.
- Nordgaard, I. 1998. Colon as a digestive organ: the importance of colonic support for energy absorption as small bowel failure proceeds. Dan Med Bull.,45: 56-135.
- Nordman, H., et al. 2002. Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. Biochem. J., 364:191–200.
- Nowrouzian, F., Adlerberth, I., Wold, AE. 2001. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. Epidemiol Infect.,126: 11-18.
- Nowrouzian, FL., Adlerberth, I., Wold, AE. 2006. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. Microbes Infect.,8: 834-840.
- O'Brien, CL.,Pavli, P., Gordon, DM., Allison, GE. 2014. Detection of bacterial DNA in lymph nodes of Crohn's disease patients using high throughput sequencing. Gut, 63(10): 596-606.

Ossa, JC., Ho, NK., Wine, E., Leung, N., Gray-Owen, SD., Sherman, PM. 2013 Adherent-invasive *Escherichia coli* blocks interferon- γ -induced signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 in human intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*, 15: 446-457.

Ouburg, S., Mallant-Hent, R., Crusius, JB., Van Bodegraven, AA., Mulder, CJ., Linskens, R., Peña, AS., Morré, SA. 2005. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14- TLR4 pathway. *Gut*, 54: 439-440.

Ouellette, AJ. 2010. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 26:547–553.

Parkes, M., Barrett, JC., Prescott, NJ., Tremelling, M., Anderson, CA., Fisher, SA., Roberts, RG., Nimmo, ER., Cummings, FR., Soars, D., Drummond, H., Lees, CW., Khawaja, SA., Bagnall, R., Burke, DA., Todhunter, CE., Ahmad, T., Onnie, CM., McArdle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, CM., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, DP., Satsangi, J., Mansfield, JC., Cardon, L., Mathew, CG. 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.*, 39: 830-832. loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.*, 39: 830-832.

Parkes, GC., Whelan, K., Lindsay, JO. 2014. Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohn's Colitis*, 8: 717-725.

Peeters, H., Bogaert, S., Laukens, D., Rottiers, P., De Keyser, F., Darfeuille-Michaud, A., Glasser, AL., Elewaut, D., De Vos, M. 2007. nCARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 in Crohn's disease. *Int J Immunogenet.*, 34: 181-191.

Penders, J., Stobberingh, EE., Brandt, PAV D., Thijs, C. 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 62(11): 1223–1236.

- Peterson, DA., Frank, DN., Pace, NR., Gordon, JI. 2008. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, 3: 417-427.
- Petersen, AM., Nielsen, EM., Litrup, E., Brynskov, J., Mirsepasi, H., Krogfelt, KA. 2009. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.*,9: 171
- Phillipson, M., Atuma, C., Henriksnas, J., Holm, L. 2002. The importance of mucus layers and bicarbonatetransport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am. J. Physiol.*, 282:211–219.
- Phillipson, M., et al. 2008. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295:806–812.
- Png, CW., Lindén, SK., Gilshenan, KS., Zoetendal, EG., Mc- Sweeney, CS., Sly, LI., McGuckin, MA., Florin, TH. 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol*, 105: 2420-2428.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, MK., Alswied, A., Roberts, CL., Song, F., Flanagan, PK., Knight, P., Codling, C., Marchesi, JR., Winstanley, C., Hall, N., Rhodes, JM., Campbell, BJ. 2014; Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut*, 63: 761-770.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., et al. 2010. “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing,” *Nature*, 464 (7285): 59–65.
- Rioux, JD., Xavier, RJ., Taylor, KD., Silverberg, MS., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, MM., Datta, LW., Shugart, YY., Griffiths, AM., Targan, SR., Ippoliti, AF., Bernard, EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhart AH., Rotter, JI., Duerr, RH., Cho, JH., Daly, MJ., Brant, SR. 2007. Genome- wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.*,39: 596-604.

- Roberts, CL., Keita, AV., Duncan, SH., O’Kennedy, N., Söderholm, JD., Rhodes, JM., Campbell, BJ. 2010. Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*, 59: 1331-1339.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, MA., Glasser, AL., Ranc, J., Hébuterne, X., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A. 2010. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut*, 59: 1355-1362.
- Rombeau JL. 2003. Rethinking the human colon: a dynamic metabolic organ. *Contemp Surg*, 59: 2-450.
- Rosenstiel, P., et al. 2007. Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J. Immunol.*, 178:8203–8211.
- Round AN, et al. 2012. Lamellar structures of MUC2-rich mucin: a potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus. *Biomacromolecules.*, 13:3253–3261.
- Rutgeerts, P., Goobes, K., Peeters, M., Hiele, M., Penninckx, F., Aerts, R., et al. 1991. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn’s disease in the neoterminal ileum. *Lancet*, 338(8770):771–4.
- Ryan, P., Bennett, MW., Aarons, S., Lee, G., Collins, JK., O’Sullivan, GC., O’Connell, J., Shanahan, F. 2002. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn’s disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*, 51: 665-670.
- Sabbah, A., Chang, TH., Harnack, R., et al. 2009. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.*, 10:1073-80.
- Sajjan, S. U., and Forstner, J. F. 1990. Role of the putative "link" glycopeptide of intestinal mucin in binding of piliated *Escherichia coli* serotype 0157:H7 strain CL-49. *Infect. Immun.*, 58:868-873.
- Salzman, NH., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson- Sjöberg, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, GM., Bevins, CL., Williams, CB., Bos, NA. 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.*, 11: 76-83.

- Sanderson, IR., Boulton, P., Menzies, I., Walker-Smith, JA. 1987. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut*, 28: 1073-1076.
- Sandle, GI. 1998. Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal. *Gut*, 43:294.
- Sanjuan, MA., Dillon, CP., Tait, SW., Moshia, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, JL., Withoff, S., Green, DR. 2007. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 450: 1253-1257.
- Sartor, RB. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134: 577-594.
- Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbin, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyıldız A., Theiss, A.L., Nusrat, A., Klapproth, J.M. 2007. Invasive *Escherichia coli* are a Feature of Crohn's Disease. *Lab Invest.*, 87(10):1042-1054.
- Schade C, Flemstrom G, Holm L. 1994. Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acidstimulated and -inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, 107:180–188.
- Schipa, S., Conte, MP., Borrelli, O., Iebba, V., Aleandri, M., Seganti, L., Longhi, C., Chiarini, F., Osborn, J., Cucchiara, S. 2009. Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 15: 661-672.
- Schultz, C., Moussa, M., van Ketel, R., Tytgat, GN., Dankert, J. 1997. Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Clin Pathol.*, 50: 573-579.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52: 237-242.
- Sepehri, S., Kotlowski, R., Bernstein, CN., Krause, DO. 2009. Phylogenetic analysis of inflammatory bowel disease associated *Escherichia coli* and the fimH virulence determinant. *Inflamm Bowel Dis.*, 15: 1737-1745.

- Sepehri, S., Khafipour, E., Bernstein, CN., Coombes, BK., Pilar, AV., Karmali, M., Ziebell, K., Krause, DO. 2011. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 17: 1451-1463.
- Shaw, MH., Reimer, T., Sanchez-Valdepenas, C., et al. 2009. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type-1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol*, 10:1267-74.
- Siddiqui, KR., Laffont, S., Powrie, F. 2010. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity.*, 32: 557-567.
- Simonsen, KT., Nielsen G., Bjerrum JV., Kruse T., Kallipolitis BH., Møller-Jensen J. 2011. A role for the RNA chaperone Hfq in controlling adherent-invasive *Escherichia coli* colonization and virulence. *PLoS One*, 6: e16387.
- Small, CL., Reid-Yu, SA., McPhee, JB., Coombes, BK. 2013. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nat Commun.*, 4: 1957.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., Tannock, GW. 2008. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis*, 14: 858-867.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez- Humarán, LG., Gratadoux, JJ., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, JP., Corthier, G., Grangette, C., Vasequez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, HM., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 16731-16736.
- Subramanian, S., Rhodes, JM., Hart, CA., Tam, B., Roberts, CL., Smith, SL., Corkill, JE., Winstanley, C., Virji, M., Campbell, BJ. 2008. Characterization of epithelial IL-8 response to inflammatory bowel disease mucosal *E. coli* and its inhibition by mesalamine. *Inflamm Bowel Dis.*, 14: 162-175.
- Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., Fagarasan, S. 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:1981-1986.

- Stevens, C., Henderson, P., Nimmo, ER., Soares, DC., Dogan, B., Simpson, KW., Barrett, JC., Wilson, DC., Satsangi, J. 2013. The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut*, 62: 695-707.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loe-ning-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., Lochs, H. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122: 44-54.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., Hale, LP. 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*, 11: 1131-1140.
- Szilagyi, A., Leighton, H., Burstein, B., Xue, X. 2014. Latitude, sunshine, and human lactase phenotype distributions may contribute to geographic patterns of modern disease: the inflammatory bowel disease model. *Clinical Epidemiology*, 6: 183–198.
- Takayama, T., Kamada, N., Chinen, H., Okamoto, S., Kitazume, MT., Chang, J., et al. 2010. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 139: 882-92.
- Takesue, Y., Ohge, H., Uemura, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Yokoyama, T., et al. 2002. Bacterial translocation in patients with Crohn's disease undergoing surgery. *Dis Colon Rectum*, 45(12):1665–71.
- Tawfik, A., Flanagan, PK., Campbell, BJ. 2014. *Escherichia coli* –host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 20(27): 8751-8763.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S-I., Kuwahara, A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59 (2):251–62.
- Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, T., Pontes, GS., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, AW., Kiyono, H. 2008. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 15;180(12):7840-6.
- Thornton DJ, et al. 1999. Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology*, 9:293–302.

- Thornton, DJ., Rousseau, K., McGuckin, MA. 2008. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Ann. Rev. Physiol.*, 70:459–486.
- Torok, HP., Glas, J., Endres, I., Tonenchi, L., Teshome, MY., Wetzke, M., et al. 2009. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.*, 104: 1723-1733.
- Vaishnava, S., Behrendt, CL., Ismail, AS., Eckmann, L., Hooper, LV. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20858-20863.
- Vaishnava, S., et al. 2011. The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 334:255–258.
- Van der Flier, LG., Clevers, H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 71: 241-260.
- Varol, C., Zigmond, E., Jung, S. 2010. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol.*, 10: 415-426.
- Vasquez, N., Mangin, I., Lepage, P., Seksik, P., Duong, JP., Blum, S., Schiffrin, E., Suau, A., Allez, M., Vernier, G., Tréton, X., Doré, J., Marteau, P., Pochart, P. 2007. Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence in situ hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis*, 13: 684-692.
- Vazeille, E., Bringer, MA., Gardarin, A., Chambon, C., Becker- Pauly, C., Pender, SL., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., Darfeuille-Michaud, A. 2011. Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive *E. coli*. *PLoS One*, 6: e21199.
- Volpp, BD., Nauseef, WM., Clark, RA. 1988. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*, 242: 1295-1297.
- Walmsley, RS., Anthony, A., Sim, R., Pounder, RE., Wakefield, AJ. 1998. Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol*, 51: 657-661.

- Wehkamp, J., Fellermann, K., Stange, EF. 2005. Human defensins in Crohn's disease. *Chem Immunol Allergy*, 86: 42-54.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., et al. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53: 1658-1664.
- Weiss, AA., Babyatsky, MW., Ogata, S., Chen, A., Itzkowitz, SH. 1996. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 44:1161–1166.
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., et al. 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455(7216): 1109–1113.
- Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman ECI, Carlstedt I. 1998. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem. J.*, 334:685–693.
- Wine, E., Ossa, JC., Gray-Owen, SD., Sherman, PM. 2009. Adherent invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol*, 9: 180.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40:235–243.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, AJ., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, JD. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56: 61-72.
- Zoetendal, E., Akkermans, A., Akkermans-van Vliet, W., de Visser, J., de Vos, W. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis*, 13: 129-134.

ÖZ GEÇMİŞ

Hüsamettin AYGÜN

Adres: Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji ABD / 21280 DİYARBAKIR
Tel: +90 412 2488550 (Ext: 3060) **GSM:** 0546 214 48 58
Email: byaygun@gmail.com

Kişisel Bilgiler

Uyruğu: T.C.
Cinsiyeti: Bay
Doğum Tarihi: 03.05.1986
İlgi Alanları: Moleküler Biyoloji, Enfeksiyon Biyolojisi, İmmünoloji, Biyoinformatik, Biyoteknoloji
Yabancı Dili: İngilizce (ÜDS: 71)

Eğitim

2012-2016: Doktora

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Diyarbakır, Türkiye

2010-2012: Yüksek Lisans

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Diyarbakır, Türkiye

2005-2009: Lisans

Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Diyarbakır, Türkiye

Yüksek Lisans Tezi:

“Bazı *Bacillus* İzolatlarının 16S rDNA Bölgelerinin Moleküler ve Biyoinformatik Karakterizasyonu”, 2012. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Diyarbakır, Türkiye.

Doktora Tezi:

“Bmsm (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) Ortamında Gelişen Crohn Hastalığı ile İlişkili Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Irkının Adeziv ve İnvaziv Özelliklerinin Karşılaştırılması”, 2016. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Diyarbakır, Türkiye.

Yurt dışı Deneyimi

D’auvergne Üniversitesi/ Centre Biomedical de Recherche et valorization. Clermont- Ferrand, Fransa. Erasmus Staj Hareketliliği Programı 2015.

Çalışılan Projeler ve Araştırmalar

1. “Bmsm (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) Ortamında Gelişen Crohn Hastalığı ile İlişkili Adherent- Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Irkının Adeziv ve İnvaziv Özelliklerinin Karşılaştırılması”, 2016. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Diyarbakır, Türkiye. (Proje 15.FEN.002).

2. TÜBİTAK Üniversite Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması-2238 (2013/1) İlk Aşama Derecesi (Araştırmacı), Proje adı: *Bacillus licheniformis*’ten elde edilen enzim kokteylinin deterjan endüstrisinde kullanımı.

Laboratuvar Teknikleri

- Hücre kültürü, Hücre enfeksiyon Teknikleri
 - Deney Hayvanları ile İlgili Uygulamalar
 - Elektroforetik ve Spektrofotometrik Yöntemler
 - DNA İzolasyon Teknikleri
 - PCR Temelli Çalışmalar
 - Biyosorpsiyon Yöntemi ile Zararlı Etkilere Sahip Boya ve Ağır Metallerin Giderimi
 - KSF (Kati-faz Fermantasyon Tekniği) ile Ekstrasellüler Enzimlerin Eldesi
 - SmF (Sub-merged Fermantasyon Tekniği) ile Ekstrasellüler Enzimlerin Eldesi
-



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU
FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI VE SOYADI	Hüsamettin AYGÜN
ÖĞRENCİ NO	12801504
EĞİTİM - ÖĞRETİM YILI	2015-2016
YARIYIL	☒ Güz ☐ Bahar
ANABİLİM DALI	BIYOLJİ
PROGRAM	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐ Tezsiz Yüksek Lisans (Dönem Projesi)
TEZ KONUSU	BMSM (Broth Mixing Sterile Mucosal Content) Ortamında Gelişen Crohn Hastalığı İle İlişkili Adherent- Invasive <i>Escherichia coli</i> (AIEC) Irkının Adeziv ve İnvaziv Özelliklerinin Karşılaştırılması

İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

RAPOR TÜRÜ	☐ Tez Savunma Sınavı Öncesi ☒ Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	114
BENZERLİK ORANI	% 2
RAPORLAMA TARİHİ	11/10/2016

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 110 sayfalık kısmına ilişkin, 11/10/2016 tarihinde tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
Hüsamettin AYGÜN

(İmza)
11/10/2016
Prof. Dr. Fikret UYAR
Tez Danışmanı

(İmza)
11/10/2016
Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN
Anabilim Dalı Başkanı